

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**Implicación de *JAK2* en el desarrollo
de los linfomas linfoblásticos de
células T.**

TESIS DOCTORAL

ANA MARÍA RONCERO SÁNCHEZ

2015

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se ha contado con la siguiente financiación:

- ◆ “Integración de estrategias genómicas en un mapa de alteraciones genéticas y epigenéticas que gobiernan el desarrollo de los linfomas linfoblásticos T”. SAF2012-36566. Proyecto de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad. IP: Dr. José Fernández Piqueras.
- ◆ “El ciclo celular y los microRNAs en la autorenovación y diferenciación de células progenitoras”. Programa de actividades I+D “Oncocycle-CM” con referencia S2010/BMD-2470. Coordinador: Dr. Marcos Malumbres (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO). 2012-2015. Responsable: Dr. José Fernández Piqueras.
- ◆ “Identificación de los genes implicados en la respuesta radioadaptativa al desarrollo de los linfomas linfoblásticos de células T inducida por la exposición a bajas dosis de radiación gamma”. CSN-UAM11062011. Proyecto de investigación del Consejo de Seguridad Nuclear. IP: Javier Santos Hernández.

Este trabajo de tesis doctoral se ha realizado con la ayuda de una beca de Formación del Profesorado Universitario (4 años) concedida por el Ministerio de Educación; además, de dos contratos para investigación a través de la Universidad Autónoma de Madrid, uno asociado al proyecto CSN-UAM11062011 (5 meses), y otro al proyecto SAF2012-36566 en colaboración con la Fundación Jiménez Díaz (2 años).

El desarrollo de esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- ◆ Leukemia. 2015 Jul 28. doi: 10.1038/leu.2015.202.

"Contribution of JAK2 mutations to T-cell lymphoblastic lymphoma development".

Roncero AM, López-Nieva P, Cobos-Fernández MA, Villa-Morales M, González-Sánchez L, López-Lorenzo JL, Llamas P, Ayuso C, Rodríguez-Pinilla SM, Arriba MC, Piris MA, Fernández-Navarro P, Fernández AF, Fraga MF, Santos J, Fernández-Piqueras J.

- ◆ Oncogene. 2010 Sep 23;29(38):5265-73. doi: 10.1038/onc.2010.280. Epub 2010 Jul 19.

"The stromal gene encoding the CD274 antigen as a genetic modifier controlling survival of mice with γ -radiation-induced T-cell lymphoblastic lymphomas".

Santos J, González-Sánchez L, Villa-Morales M, Ors I, López-Nieva P, Vaquero C, González-Gugel E, Fernández-Navarro P, Roncero AM, Guenet JL, Montagutelli X, Fernández-Piqueras J.

*A mi familia, mis padres y mi
hermano, por estar siempre a mi
lado, y a ti Víctor, por ayudarme a
conseguir este sueño.*

***“Cree a aquellos que buscan la verdad,
duda de los que la han encontrado”.***

André Guide.

***“Quien no haya experimentado la irresistible
atracción de la ciencia, no podrá comprender
su tiranía”***

Frankenstein de Mary Shelley.



Agradecimientos



Esta es una parte muy especial de mi tesis doctoral, porque sin duda tengo más de mil gracias para tantas personas. Ya que desde que comencé en este camino de la ciencia han sido muchas las personas que me han ayudado y me han hecho crecer como persona. Por el día a día, por un pequeño instante, por algo bueno o también por lo malo, al final cada uno es como es por las personas que han pasado por nuestra vida.

Quisiera empezar por dar las gracias a Pepe y Javier por permitirme formar parte de su laboratorio, y sobre todo agradecerles por el grupo de personas que forman parte del laboratorio 327 del CBMSO, son irremplazables. A Pepe y Pilar les agradezco haberme dirigido durante todos estos años en el proceso de mi tesis doctoral, por vuestros consejos y ayuda, y por confiar en mí para llevar a cabo este trabajo. Aunque a ti Pepe te agradezco especialmente por abrirme las puertas de tu laboratorio para realizar el proyecto fin de Máster, y por permitirme crecer cada día como investigadora con nuevos retos, que no han sido pocos los que nos hemos encontrado a lo largo de esta tesis.

De los compañeros qué decir, no tengo suficientes palabras ni siquiera para expresarlo. Sobre todo a ti Laura, desde que entré en el 327 tú has sido no sólo la persona que me enseñó todo lo que sé sino también un apoyo incondicional, tenías las palabras adecuadas para los días duros, o simplemente estabas ahí, y aún hoy sigues ahí cada día. Porque ya no eres una compañera, eres una amiga con la que he compartido momentos geniales dentro y fuera del laboratorio. Gracias Laura. María Angeles, bueno Chini, que raro es llamarte María Angeles. Tú entraste un par de años después que yo pero me cuesta recordarlo, parece que has estado siempre ahí, trabajando a tope a mi lado, ofreciendo tus consejos y dando ánimos. Nunca olvidaré el año que trabajamos codo con codo, me llevo un montón de increíbles momentos, porque nos ha pasado de todo. María a ti te doy las gracias por ser un modelo a seguir, a veces es increíble cómo puedes llevar tu trabajo en el laboratorio y las clases. También porque me has enseñado un montón de cosas, sobre todo gracias por tu intensivo de EndNote, y gracias por ser tan buena enseñando. Bueno ahora te toca a ti María del Carmen de Arriba (ya sé que te encanta usar tu nombre completo), qué decir de ti, eres única, gracias por ser como eres, creo que nunca olvidaré cierta tarde contigo, nunca pensé que en días tan duros pudiera reirme tanto. También te estoy agradecida por cuidar tanto de mí, como dijo Manu eres la cuidadora.

No puedo olvidarme de los que ya no están, porque todos han dejado un recuerdo especial en mí, Helena, aún me parece que te voy a escuchar cantando en tu sitio. Inma, al principio tan discreta pero luego es cuestión de conocerte, muchas gracias también por los días que me echabas una mano especialmente

con los ratones. Manu, muchas gracias por los buenos ratos hablando de nuestras series, los echo de menos. Conchi gracias por tu compañía por las tardes. Además, desde que entré en el laboratorio ha sido un continuo ir y venir de estudiantes, aunque sin duda me quedo con dos, mis niñas, Bárbara y Ester. Gracias por haber sido unas estudiantes con tanta paciencia porque me habéis aguantado justo en los peores años, en especial tú Ester, que has vivido un artículo y una tesis, pero no sólo fuiste súper aplicada sino que hubo muchos momentos en los que hasta me echaste una mano. Muchas gracias Ester, no cambies nunca, eres genial. Por último, los nuevos, José Luis e Irene, gracias también por forma parte de esta última etapa de mi tesis. He vivido tardes geniales a vuestro lado, sobre todo contigo Irene, que eres un tornado por donde pasas.

También quiero dar las gracias y no olvidarme de mis compis en la universidad, que hicieron que los cinco años pasaran volando. Gracias Ana, Brian, Diego, Enrique, Fer, Rodri y Mario.

Tampoco me olvido de mis amigos, los no científicos, vosotros sois los que me habéis dado ese respiro, he podido desconectar muchas veces gracias a vosotros. Qué deciros, he vivido muchísimo con vosotros, sobre todo con Noemí y Mari que desde el colegio anda que no hemos tenido grandes momentos. Pero también Héctor, Bea estos últimos años con vosotros han sido geniales. Muchas gracias de verdad.

Y bueno al final, vosotros, mi familia, a mis padres, María Alarcos y Francisco, y a mi hermano Francisco Javier, infinitas gracias. Habéis estado a mi lado desde el primer momento, me habéis apoyado, ayudado, cuidado, me lo habéis dado todo. Siempre os estaré agradecida por ayudarme día a día a crecer como persona y apoyarme en este duro camino. Soy quién soy gracias a vosotros.

También Víctor, Pepa y José, mi segunda familia. Os estoy muy agradecida por tantas cosas, sobre todo a ti Víctor, gracias por tu infinita paciencia, por esperarme cada día con palabras de ánimo, de apoyo y de cariño, gracias a ti he sacado fuerzas para los momentos duros. Gracias por seguir día a día a mi lado y por querer compartir muchos más días juntos. Acabamos juntos esta etapa pero comenzamos otra. Gracias Víctor.



Índice

ABREVIATURAS.	7
RESUMEN.	13
SUMMARY.	17
INTRODUCCIÓN.	21
1.- El cáncer.	23
1.1.- El cáncer: un problema genético.	23
1.2.- Epigenética y cáncer.	25
1.3.- Modelos para el desarrollo del cáncer.	27
2.- Neoplasias linfoblásticas de células T precursoras.	29
2.1.- Alteraciones genéticas más frecuentes en las neoplasias linfoblásticas de células T precursoras.	30
3.- La vía JAK-STAT.	34
3.1.- La familia de las Janus quinasas.	34
4.- La vía no canónica mediada por JAK.	38
5.- Alteraciones de la vía JAK-STAT en tumores hematológicos.	38
OBJETIVOS.	41
MATERIALES Y MÉTODOS.	45
1.- Material de trabajo.	47
1.1.- Biopsias humanas.	47
1.2.- Líneas celulares.	47
1.2.1.- Cultivos celulares.	48
1.2.2.- Tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina (AZA) y Tricostatina A (TSA).	49
1.3.- Plásmidos y construcciones.	49
2.- Análisis de ADN.	50
2.1.- Extracción de ADN.	50
2.2.- Modificación del ADN con bisulfito sódico.	51
2.3.- Reacción en Cadena de la Polimerasa Específica de Metilación (MSP).	51

2.4.- Secuenciación Genómica de ADN modificado con bisulfito sódico.	52
2.5.- Pirosecuenciación.	52
3.- Análisis de ARNm.	53
3.1.- Extracción de ARN.	53
3.2.- Identificación de la translocación TEL-JAK2.	54
3.3.- Búsqueda de mutaciones del gen JAK2.	54
3.4.- RT-PCR cuantitativa a tiempo a real.	55
4.- Análisis de proteínas.	55
4.1.- Extracción de proteínas.	55
4.2.- Western blot.	56
4.3.- Inmunoprecipitación.	57
4.4.- Inmunofluorescencia.	58
4.5.- Inmunohistoquímica.	59
5.- Ensayos funcionales.	59
5.1.- Generación de mutantes de JAK2 mediante mutagénesis dirigida.	59
5.2.- Ensayos luciferasa.	60
5.3.- Ensayos de proliferación y viabilidad.	60
5.4.- Activación de la vía JAK-STAT en las células BaF3-EpoR estables.	61
6.- Análisis Estadístico.	61
RESULTADOS.	63
1.- Una muestra de T-LBL primario humano presenta una translocación TEL-JAK2 t(9;12)(p24;p13).	65
2.- Seis mutaciones en el gen JAK2 en dos T-LBLs pediátricos sugieren la existencia de una heterogeneidad sub-clonal en estos tumores.	67
3.- Análisis funcional “in silico” de las mutaciones.	70
4.- Ensayos luciferasa en células deficientes para JAK2 demuestran que sólo las mutaciones H574R y R683G son capaces de sobre-activar la vía JAK-STAT.	71

5.- Los ensayos realizados con una línea celular dependiente de citoquina demuestran que la mutación R683G es capaz de inducir proliferación celular con independencia de citoquina.	73
6.- Alteraciones epigenéticas en los reguladores negativos de la vía JAK-STAT.	76
6.1.- La hipermetilación de SOCS3 podría contribuir a la activación de la vía JAK-STAT en los linfomas con JAK2 mutado.	77
6.2.- La hipermetilación de SOCS3 no es una propiedad exclusiva de los linfomas con JAK2 mutado.	79
6.3.- Los tratamientos de las células Jurkat y Molt-4 con drogas demetilantes e inhibidores de deacetilasas aumentan significativamente la expresión de SOCS3.	82
7.- Las mutaciones activantes de JAK2 no son capaces de incrementar los niveles de pSOCS3 endógenos de las células BaF3-EpoR y γ 2A.	84
8.- Activación del gen LMO2 por JAK2 a través de una vía no-canónica.	85
8.1.- Todas las mutaciones de JAK2 son capaces de aumentar significativamente los niveles de expresión transcripcional de LMO2.	85
8.2.- Relación entre la presencia de JAK2 en el núcleo y su capacidad para inducir la expresión de LMO2.	86
8.3.- La co-transfección de STAT5A y JAK2 reduce considerablemente la capacidad de los mutantes para inducir la expresión del gen LMO2.	87
8.4.- Existe una correlación entre los niveles de expresión de JAK2 y LMO2 en los tres T-LBLs primarios con mutaciones en JAK2.	90
DISCUSIÓN.	95
1.- Las mutaciones en el gen JAK2 son un evento significativo en el desarrollo de los T-LBLs.	97
2.- Dos de las mutaciones identificadas, R683G y H574R, son capaces de activar constitutivamente la vía JAK-STAT y de permitir la proliferación de células BaF3-EpoR en ausencia de citoquina.	101
3.- La metilación del promotor del gen SOCS3 es un evento frecuente en los T-LBLs y podría actuar potenciando los efectos de las mutaciones activantes.	102

<i>4.- Todas las mutaciones de cambio de sentido halladas en el gen JAK2 son capaces de activar la expresión del oncogén LMO2 a través de una vía no canónica.</i>	103
<i>5.- La contribución del gen JAK2 al desarrollo de los linfomas linfoblásticos de células T.</i>	106
CONCLUSIONES.	109
BIBLIOGRAFÍA.	113
ANEXO I.	125
ANEXO II.	131



Abreviaturas



ABL1	Gen que codifica para la proteína tirosina quinasa Abelson 1.
aCML	A typical C hronic M yeloid L eukemia (leucemia mieloide crónica atípica).
ADAR	A denosine D eaminases A cting on R NA (adenosin-desaminasas que actúan en ARN).
ADN	Á cido D esoxirribonucleico.
ADNc	Á cido D esoxirribonucleico c omplementario.
AID	A ctivation- I nduced cytidine D eaminase (desaminasa de citidina inducida por activación).
AML	A cute M yeloid L eukemia (leucemia mieloide aguda).
APOB	Gen que codifica para la Apolipoproteína B.
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA Editing (enzima que edita el ARNm de Apolipoproteína B).
ARN	Á cido R ibonucleico.
ARNm	Á cido R ibonucleico m ensajero.
ARNnc	Á cido R ibonucleico n o c odificante.
AZA	5- A za-2'-deoxycytidine (5-aza-2'-deoxicitidina).
AZIN1	Gen que codifica para el inhibidor de antizimas 1.
B2-M	Gen que codifica para la B eta- 2 microglobulina.
B-ALL	B -cell A cute L ymphoblastic L eukemia (leucemia linfoblástica aguda de células B).
BCL11B	Gen que codifica para la proteína B - C ell C LL/ L ymphoma 11B.
BCR	Gen que codifica para la proteína B reakpoint C luster R egion.
CDKN2A	Gen que codifica para el inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina.
CDKN2B	Gen que codifica para el inhibidor 2B de quinasa dependiente de ciclina.
CHO	C hinese H amster O vary cells (células derivadas de ovario de hámster chino).
CLP	C ommon L ymphoid P recursors (progenitor linfoide común).
CML	C hronic M yeloid L eukemia (leucemia mieloide crónica).
c-MYC	Gen que codifica para la proteína c-Myc.
CNV	C opy N umber V ariation (variación en el número de copias).

E2F	Gen que codifica para el factor de transcripción E2F.
EPHA7	Gen que codifica para el receptor 7 de efrina clase A.
Epo	Erythropoietin (eritropoyetina).
EpoR	Gen que codifica para el receptor de eritropoyetina.
ET	Essential Thrombocythemia (trombocitemia esencial).
ETP	Early T-cell Progenitors (progenitor temprano de células T).
ETV6	Gen que codifica para el factor de transcripción <i>Ets Variant 6</i> .
Fas	Fas cell surface death receptor (receptor de muerte Fas).
FasL	Fas Ligand (Fas ligando).
FBXW7	Gen que codifica para la proteína <i>F-box FbW7</i> .
GKM	Gatekeeper Mutation (mutación <i>gatekeeper</i>).
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (cáncer de colon hereditario no polipósico).
HP1α	Heterochromatin protein 1 alpha (proteína alpha 1 de la heterocromatina).
HSC	Hematopoietic Stem Cells (célula madre hematopoyética).
JAK	Janus Kinase (quinasa Janus).
JH	Janus Homology domain (dominio de homología Janus).
LEF1	Gen que codifica para el factor de unión activador linfóide 1.
LMO2	Gen que codifica para la proteína LIM domain Only 2 .
MLH1	Gen que codifica para la proteína MutL Homólogo 1 .
MMP	Multipotent Progenitor cell (progenitor multipotente).
MSH2	Gen que codifica para la proteína MutS Homólogo 2 .
MSP	Methylation-Specific PCR (PCR específica de metilación).
NOTCH1	Gen que codifica para la proteína Notch1.
ONC	Oncogene (oncogén).
PCM1	Gen que codifica para la proteína del material pericentriolar tipo 1.
PCR	Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa).
PMF	Primary Myelofibrosis (mielofibrosis primaria).
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase (fosfatasa de tirosinas).
PV	Polycythemia Vera (policitemia vera).

qRT-PCR	Q uantitative R everse T ranscription PCR (RT-PCR cuantitativa).
SCID-X1	X-linked S evere C ombined I mmunodeficiency (inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X).
SH2	S rc H omology 2 domain (dominio de homología Src 2).
SHP1	Gen que codifica para la fosfatasa de tirosinas que contiene dominio SH2.
SMO	Gen que codifica para la proteína <i>Smoothened</i> .
SNV	S ingle N ucleotide V ariant (cambio de un único nucleótido).
SOCS	S uppressor O f C ytokine S ignaling (supresor de la señalización por citoquinas).
STAT	S ignal T ransducer and A ctivator of T ranscription (factor transductor y activador de la transcripción).
T-ALL	T -cell A cute L ymphoblastic L eukemia (leucemia linfoblástica aguda de células T).
TCR	T - C ell R eceptor (receptor de células T).
TdT	T erminal D eoxynucleotidyl T ransferase (desoxirribonucleotidil transferasa terminal).
T-LBL	T -cell L ymphoblastic L ymphoma (linfoma linfoblástico de células T).
TPG	T umour- P rogenitor g ene (gen progenitor de tumores).
Trp53	Gen que codifica para la proteína p53.
TSA	T richostatin A (tricostatina A).
TSG	T umour S uppressor G ene (gen supresor de tumores).
TSS	T ranscription S tart S ite (secuencia de inicio de la transcripción).
TYK2	Gen que codifica para la tirosina quinasa 2.
WB	W estern B lot.
WHO	W orld H ealth O rganization (Organización Mundial de la Salud).
WT1	Gen que codifica para la proteína WT1.



Resumen



La vía JAK-STAT juega un papel importante en la proliferación, supervivencia y diferenciación de células progenitoras linfoides. Sin embargo, se sabe muy poco de la contribución de JAK2 al desarrollo de los linfomas linfoblásticos de células T (T-LBL). En esta tesis hemos identificado una muestra con una translocación activante TEL-JAK2, y seis mutaciones de cambio de sentido que se reparten en dos de las 16 muestras de T-LBL analizadas. Tres de estas mutaciones son nuevas para el gen *JAK2*, y las otras se describen por primera vez en T-LBLs. Curiosamente, las mutaciones I682T y R683G podrían haber surgido por un mecanismo de editado del ARN. Además, los dos linfomas con las mutaciones de *JAK2* mostraron cada uno diferentes transcritos mutantes lo que sugiere la existencia de heterogeneidad sub-clonal. Los ensayos funcionales revelaron que las mutaciones H574R y R683G son capaces de activar constitutivamente la vía JAK-STAT en las células γ 2A, y de permitir la proliferación de las células BaF3-EpoR en ausencia de citoquina. Por otro lado, la hipermetilación aberrante del promotor de *SOCS3* podría estar contribuyendo a la activación de la vía JAK-STAT. Uno de los aspectos de mayor interés es que las muestras con mutaciones en *JAK2* presentan unos niveles más elevados de expresión del gen *LMO2* en los linfomas primarios, sugiriendo un nexo de unión entre el carácter mutacional de *JAK2* y la capacidad de inducir a *LMO2*, que fue confirmado mediante transfecciones en las células γ 2A con cada una de las seis mutaciones. Por tanto, proponemos que *JAK2* puede contribuir al desarrollo de los T-LBLs por medio de dos mecanismos diferentes, y que el uso de pan-inhibidores de las quinasas JAKs en combinación con drogas epigenéticas debería ser considerado en los futuros tratamientos de estos pacientes.



Summary



The JAK-STAT pathway has a substantial role in lymphoid precursor cell proliferation, survival and differentiation. Nonetheless, the contribution of JAK2 to T-cell lymphoblastic lymphoma (T-LBL) development remains poorly understood. We have identified one activating TEL-JAK2 translocation and six missense mutations accumulated in two out of 16 T-LBL samples. Three of them are novel JAK2 mutations and the others are reported for the first time in T-LBL. Notably, R683G and I682T might have arisen owing to RNA editing. Mutated samples showed different mutated transcripts suggesting sub-clonal heterogeneity. Functional approaches revealed that two JAK2 mutations (H574R and R683G) constitutively activate JAK-STAT signaling in γ 2A cells and can drive the proliferation of BaF3-EpoR cytokine-dependent cell line. In addition, aberrant hypermethylation of SOCS3 might contribute to enhance the activation of JAK-STAT signaling. Of utmost interest is that primary T-LBL samples harboring JAK2 mutations exhibited increased expression of LMO2, suggesting a mechanistic link between JAK2 mutations and the expression of LMO2, which was confirmed for the six missense mutations in transfected γ 2A cells. We therefore propose that active JAK2 contribute to T-LBL development by two different mechanisms, and that the use of pan-JAK inhibitors in combination with epigenetic drugs should be considered in future treatments.



Introducción



1.- El cáncer.

El cáncer se podría definir como un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo y descontrolado de células que invaden y dañan tejidos y órganos, provocando finalmente la muerte del individuo (Muñoz y Barbacid, 1997). Este heterogéneo grupo de enfermedades surgen a partir de una célula iniciadora que sería reprogramada para originar un grupo de células que, con el tiempo, acumularían múltiples cambios genéticos y epigenéticos hasta desarrollar un cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.1.- El cáncer: un problema genético.

El cáncer siempre es un problema genético porque necesita que se produzcan alteraciones en dos tipos de genes: oncogenes y genes supresores (Weinberg, 1995; Haber y Harlow, 1997; Hunter, 1997). Sin embargo, los cánceres rara vez son hereditarios. La inmensa mayoría son esporádicos porque no parten de la herencia de una copia mutada de un gen mayor de susceptibilidad, típicamente un gen supresor. Se trata por tanto de mutaciones somáticas. En una minoría de casos (menos del 10%) hay cánceres hereditarios (ligados a síndromes concretos) porque se parte de una copia mutada de un gen mayor de susceptibilidad. También se podría hablar de cánceres familiares para referirse a aquellos casos en los que hay una mayor predisposición (riesgo) familiar aunque no atribuible a la herencia de ninguna copia mutada en un gen de susceptibilidad (Balmain *et al.*, 2003).

Los oncogenes derivan de la activación de copias normales de genes existentes en las células (proto-oncogenes) mediante mutaciones dominantes de ganancia de función, y se caracterizan por su contribución a la proliferación celular, o por la inhibición de los procesos apoptóticos. En un sentido amplio podrían incluir también genes capaces de inhibir los procesos de diferenciación, de reprogramar las células cancerígenas, o de promover la angiogénesis, la invasividad o la metástasis, etc.

Los genes supresores de tumores codifican proteínas implicadas en señales anti-proliferativas, en la inducción de apoptosis, o en el control de la integridad y estabilidad del genoma. En el cáncer, estos genes serían inactivados por mutaciones recesivas de pérdida de función.

La mayor parte de los autores coinciden en que los genes de reparación del ADN pueden ser considerados genes supresores de tumores *bona fide*, porque a pesar de que no estén implicados directamente en el control del ciclo o en la muerte celular, se inactivan mediante mutaciones recesivas de pérdida de función, y porque su desregulación puede contribuir decisivamente al desarrollo tumoral. El ejemplo más paradigmático quizás sea el de los cánceres gastrointestinales, y más específicamente el del cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC) que se inician, según propuso el Dr. Manuel Perucho, con un fenotipo mutador (como alternativa a la vía supresora clásica) generado por la inactivación de algún gen del sistema de reparación *mismatch* como *MSH2* o *MLH1* (Yamamoto *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1999; Loeb, 2001). Los genes supresores, incluyendo los genes de reparación, son los genes mayores de susceptibilidad implicados en los síndromes hereditarios.

Aunque se han descrito muchos oncogenes y genes supresores de tumores, todos ellos se distribuyen en 12 vías de señalización alteradas en cáncer (incluyendo la vía JAK-STAT), que controlan a su vez tres procesos claves de la fisiología celular: la supervivencia, la diferenciación celular y el mantenimiento de la estabilidad genómica (Vogelstein y Kinzler, 2004; Hanahan y Weinberg, 2011; Vogelstein *et al.*, 2013) ([Figura 1](#)).

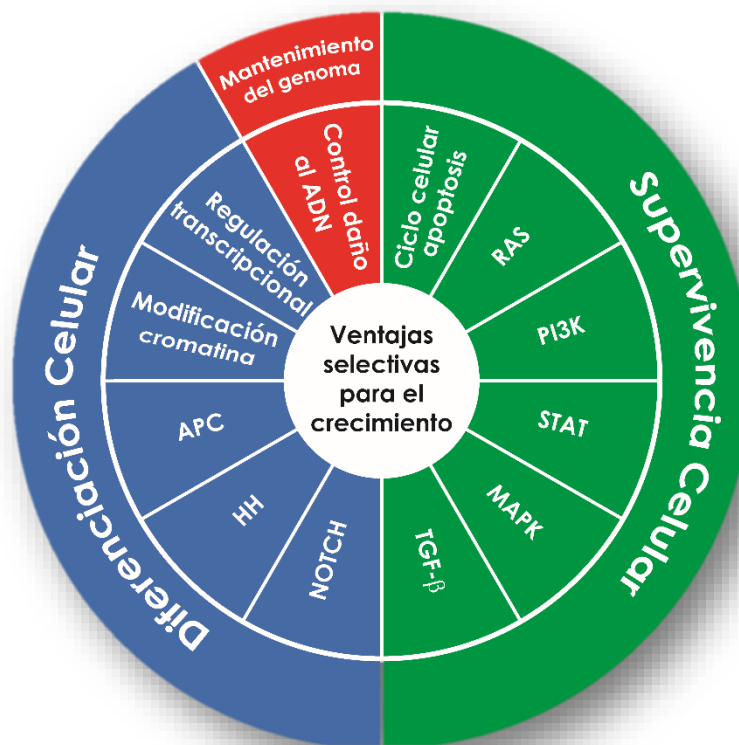


Figura 1. Vías de señalización alteradas en cáncer y los procesos celulares que regulan.

Esquema que representa los tres principales procesos celulares que se ven alterados en el cáncer (supervivencia, diferenciación y mantenimiento del genoma), así como los principales genes y vías de señalización implicados. Creada a partir de Vogelstein *et al.*, 2013.

1.2.- Epigenética y cáncer.

Además de las mutaciones, la alteración de los patrones epigenéticos normales es una característica intrínseca del desarrollo tumoral. La hipometilación global del ADN fue la primera alteración epigenética identificada en cáncer (Feinberg y Vogelstein, 1983). Desde entonces se han ido añadiendo otras alteraciones epigenéticas como la hidroximetilación del ADN, modificaciones post-traduccionales de las histonas, remodelación del nucleosoma y regulación por ARNs no codificantes (ARNncs) (Esteller *et al.*, 2001; Esteller, 2007; Esteller, 2008; Kulis y Esteller, 2010; Dawson y Kouzarides, 2012; You y Jones, 2012; Paska y Hudler, 2015).

En mamíferos la metilación del ADN tiene lugar generalmente en la posición 5' del anillo de la citosina en los dinucleótidos CpG, aunque se han identificado otros sitios “metilables” en células troncales de mamíferos y, recientemente, en diversos tejidos (Lister *et al.*, 2009; Schultz *et al.*, 2015). Los dinucleótidos CpG se reparten por todo el genoma, aunque suelen agruparse en regiones muy concretas del genoma, sobre todo en las llamadas islas CpG no metiladas (CGI) que se encuentran en los promotores de más del 60% de los genes en torno al sitio de inicio de su transcripción (Illingworth y Bird, 2009). La metilación de las islas CpG se asocia con el silenciamiento de genes, mientras que su demetilación causaría el efecto contrario. De este modo, la hipometilación podría suponer la activación de un oncogén o de secuencias repetidas y transposones (normalmente hipermetiladas), y la hipermetilación de las islas CpG podría estar relacionada con la inactivación de genes supresores de tumores (Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011; Paska y Hudler, 2015) (**Figura 2** y **Figura 3**).

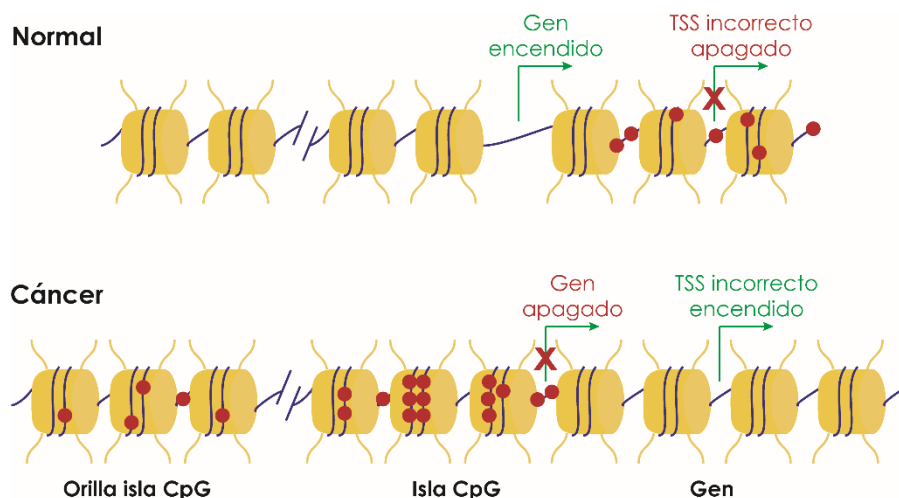


Figura 2. Patrones de metilación de los promotores en células normales y tumorales. El esquema superior muestra la situación de una célula normal donde las islas CpG y sus proximidades (orillas de las islas CpG) se encuentran demetiladas permitiendo la transcripción de los genes. Además, la metilación dentro de la secuencia génica podría impedir que se realice la transcripción en lugares incorrectos. Sin embargo, en una célula tumoral se invierte la situación: la transcripción del gen se inactiva ya que sus islas CpG y proximidades se encuentran hipermetiladas, y por otro lado las secuencias génicas pasan a un estado hipometilado generándose lugares incorrectos de transcripción. **TSS:** secuencias de inicio de la transcripción. Creada a partir de Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011.

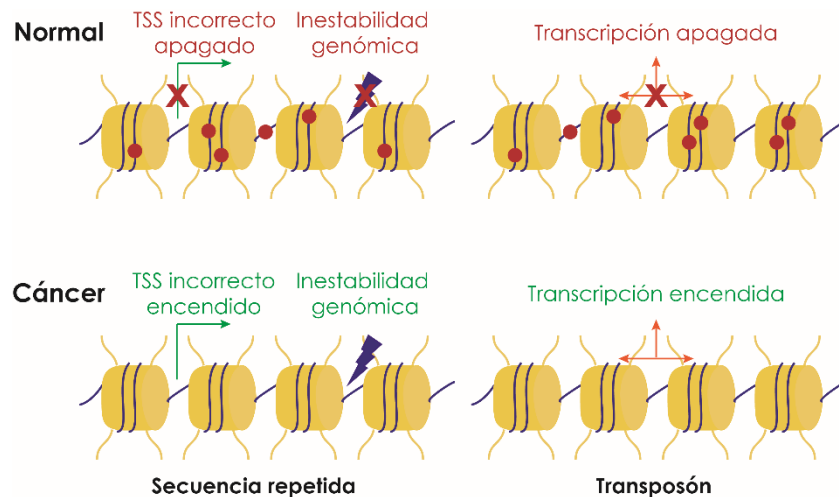


Figura 3. Patrones de metilación de secuencias repetidas y transposones en células normales y tumorales. El esquema superior muestra una célula normal en la que la transcripción de secuencias repetidas y transposones se encuentra silenciada por su alto grado de metilación, protegiendo a su vez a la estabilidad del genoma. Por el contrario, en una célula tumoral las secuencias repetidas y transposones pasan a un estado hipometilado que permite su transcripción, generando un cuadro de inestabilidad genómica. **TSS**: secuencias de inicio de la transcripción. Creada a partir de Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011.

1.3.- Modelos para el desarrollo del cáncer.

El modelo genético publicado por Peter Nowell (Nowell, 1976) se basaba en la aparición de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores en una célula iniciadora que conferirían a esta célula la capacidad de proliferar y expandirse más rápidamente que las células normales (**Figura 4**). El resultado sería la generación de una sub-población celular con una ventaja frente a las células que no portan la mutación, de modo que según este modelo el desarrollo del cáncer seguiría las reglas de la evolución Darwiniana (Feinberg *et al.*, 2006).

Con el estudio de la implicación de los procesos epigenéticos en el cáncer, surgió un nuevo modelo (**Figura 5**) donde los cambios epigenéticos se consideran como un primer evento impulsor en una célula progenitora (Feinberg *et al.*, 2006).

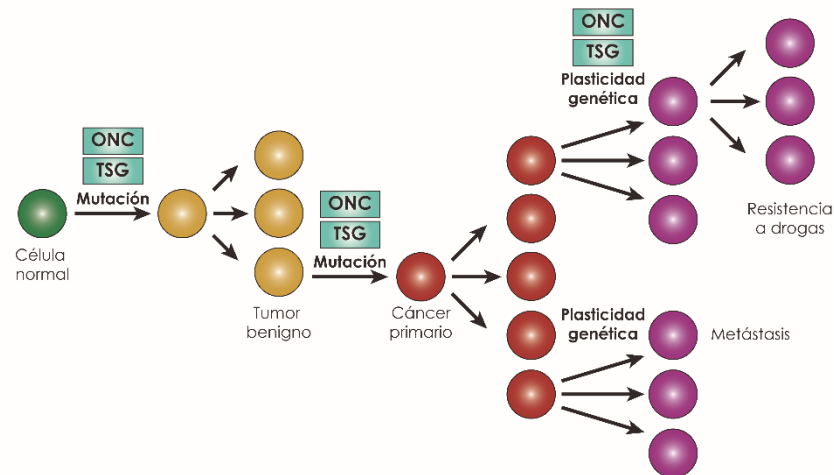


Figura 4. Modelo genético del cáncer a partir de un único clon. A partir de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores surgiría una célula que tendría un mayor crecimiento. Esta célula originaría una sub-población celular que iría adquiriendo las diferentes propiedades tumorales (invasión, resistencia a tratamientos y metástasis) por la adquisición de nuevas mutaciones. **ONC**: oncogén; **TSG**: gen supresor de tumores. Creada a partir de Feinberg *et al.*, 2006.

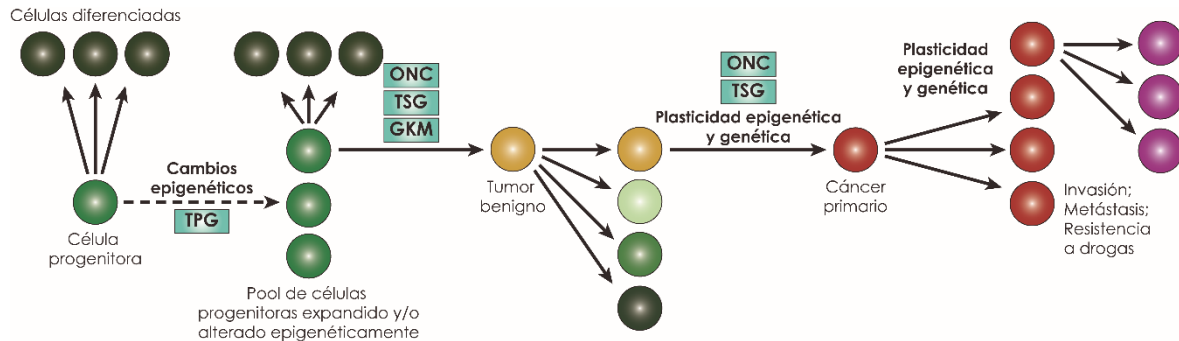


Figura 5. Modelo del cáncer a partir de un progenitor epigenético. En este modelo el tumor se originaría a partir de tres pasos. El primero sería una alteración epigenética en una célula madre o progenitora. El segundo consistiría en la mutación en un oncogén o un gen supresor en tumores sólidos, o un reordenamiento cromosómico en leucemias y linfomas. El tercer evento consistiría en la generación de una inestabilidad genética y epigenética que permitiría la rápida evolución del tumor. **TPG**: gen progenitor; **ONC**: oncogén; **TSG**: gen supresor de tumores; **GKM**: mutación gatekeeper. Creada a partir de Feinberg *et al.*, 2006.

En este modelo el tumor se originaría mediante la sucesión de tres pasos. El primero sería la alteración epigenética de un gen progenitor en una célula pre-tumoral que supondría la expansión de un *pool* de células progenitoras. El segundo consistiría en una mutación *gatekeeper*, típicamente una mutación inactivante de un gen supresor (en el caso de tumores sólidos) o un reordenamiento cromosómico en un oncogén clave (en el caso de leucemias y linfomas). El tercer evento consistiría en la generación de una gran inestabilidad genética y epigenética que permitiría la rápida evolución del tumor.

2.- Neoplasias linfoblásticas de células T precursoras.

Las neoplasias de células T se dividen en dos grandes grupos, por un lado las neoplasias linfoblásticas de células T precursoras, que se originan a partir de timocitos inmaduros, y por otro lado las neoplasias de células T maduras, que son causadas por timocitos maduros tras su desarrollo en el timo (Swerdlow *et al.* (Eds.), 2008; de Leval *et al.*, 2009).

Las neoplasias linfoblásticas de células T precursoras se caracterizan por la proliferación descontrolada de linfoblastos conminados al linaje T tras su entrada en el timo. Constituyen un tipo de cáncer hematológico muy agresivo que se desarrolla principalmente en niños (sobre todo adolescentes varones), aunque también puede desarrollarse en adultos. La manifestación más frecuente de esta enfermedad afecta principalmente a la médula ósea y la sangre, y en estos casos se denomina leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL). De forma menos frecuente, se puede manifestar como una masa tumoral en el timo/mediastino anterior o en los nódulos linfáticos, y con menos de un 25% de infiltración blástica en la médula ósea, denominándose entonces linfomas linfoblásticos de células T (T-LBL) (de Leval *et al.*, 2009; Burkhardt, 2010). La Organización Mundial de la Salud (WHO) acordó designar ambos casos como leucemias/linfomas linfoblásticos de células T al considerarlas como dos manifestaciones diferentes de una misma enfermedad (Swerdlow *et al.* (Eds.), 2008; de Leval *et al.*, 2009). Pero se han descrito numerosas diferencias a nivel genético y molecular que justificarían la consideración por separado de ambos subgrupos (T-LBL y T-ALL) (Burkhardt, 2010; Basso *et al.*, 2011).

Las leucemias/linfomas linfoblásticos de células T están formados por blastos de mediano tamaño con núcleos redondeados o irregulares con una alta actividad mitótica. El inmunofenotipo de estas enfermedades se corresponde con los diferentes estadios de maduración de los timocitos, y generalmente son células que expresan la proteína desoxirribonucleotidil transferasa terminal (TdT). Además, es frecuente que expresen marcadores como CD34 y CD99, y diferentes combinaciones de CD4 y CD8 (de Leval *et al.*, 2009; Burkhardt, 2010) (**Figura 6**). Según la WHO se pueden clasificar en diferentes grupos según el tipo de antígenos que expresen o el estadio de diferenciación intratímica de los timocitos tumorales en: (1) proT (cCD3⁺, CD7⁺, CD2⁻, CD1α⁻, CD34^{+/-}), (2) preT (cCD3⁺, CD7⁺, CD2⁺, CD1α, CD34^{+/-}), (3) T-cortical (cCD3⁺, CD7⁺, CD2⁺, CD1α⁺, CD34⁻) y (4) T-medular (cCD3⁺, CD7⁺, CD2⁺, CD1α⁻, CD34⁻, sCD3⁺), (**c** indica expresión citoplasmática y **s** expresión en superficie o membrana) (Aifantis *et al.*, 2008).

2.1.- Alteraciones genéticas más frecuentes en las neoplasias linfoblásticas de células T precursoras.

Desde hace varios años el trabajo de nuestro equipo se ha centrado en la búsqueda y caracterización de genes involucrados en el desarrollo de los linfomas linfoblásticos de células T murinos que surgen en ratones deficientes para *Trp53* o que son inducidos mediante radiación γ . Muchos de nuestros resultados en ratón fueron confirmados después en muestras humanas. Entre nuestras aportaciones más recientes cabría destacar: (1) la demostración del silenciamiento epigenético de un pool de microARNs que controlan la expresión de oncogenes críticos como *ABL1*, *BCR-ABL*, *c-MYC*, *E2F* y *SMO* (Bueno *et al.*, 2008; Bueno *et al.*, 2010; Bueno *et al.*, 2011; Gonzalez-Gugel *et al.*, 2013); (2) la identificación de alteraciones en dos genes expresados en el estroma tímico que juegan un papel importante en la supervivencia de los ratones con este tipo de tumores (Santos *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010); (3) la identificación de *EPHA7* como un nuevo gen supresor en la deleción 6q (Lopez-Nieva *et al.*, 2012); y (4) la implicación de la vía de señalización apoptótica Fas/FasL (Villa-Morales *et al.*, 2006; Villa-Morales *et al.*, 2007; Villa-Morales *et al.*, 2010; Villa-Morales *et al.*, 2014).

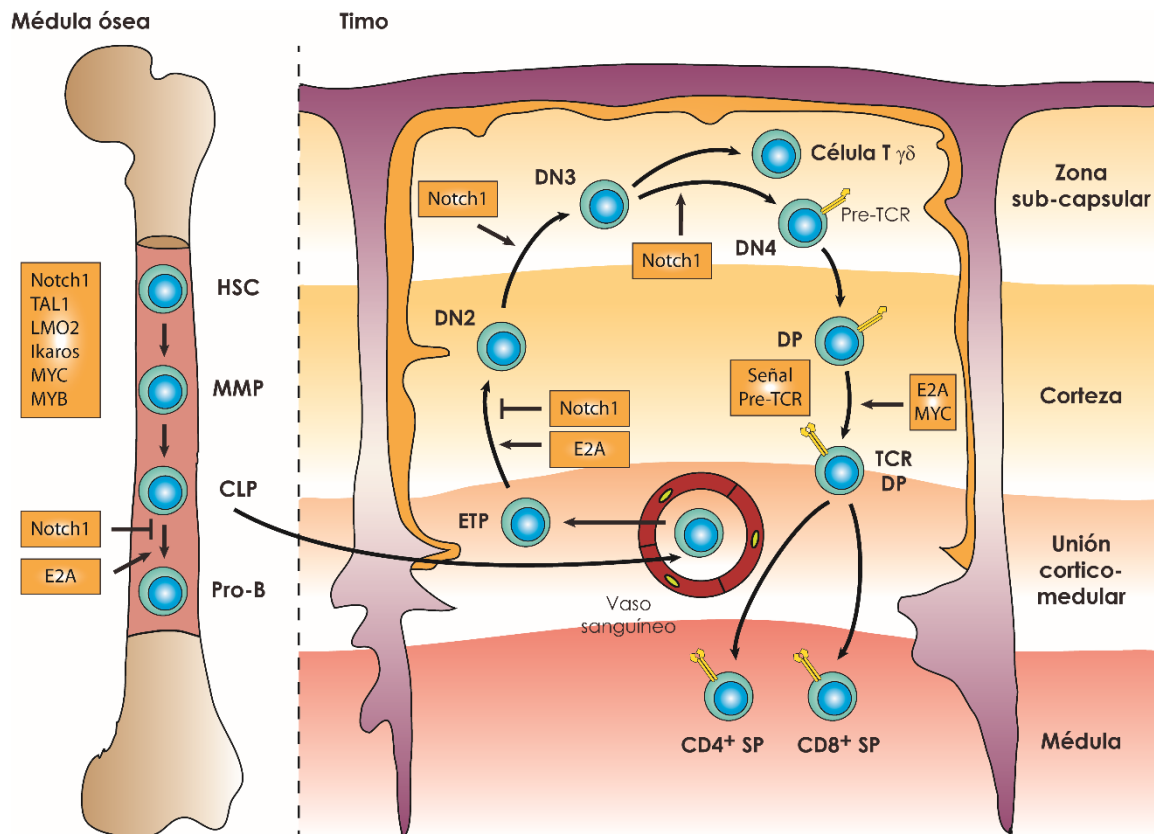


Figura 6. Diferentes estadios de la hematopoyesis y el desarrollo de las células T. Los progenitores linfoides comunes migran al timo y una vez allí pasan a ser las células progenitoras tempranas de timocitos, comprometiéndose en el linaje de células T. A continuación experimentan diferentes etapas en su proceso de diferenciación desde doble negativas (DN: CD4⁻ CD8⁻) a simple positivas (SP: CD4⁺ o CD8⁺), pasando por la expresión en membrana del receptor pre-TCR en DN4 y del TCR completo cuando son doble positivas (DP: CD4⁺ CD8⁺). Cada una de las etapas está regulada por oncogenes claves como *NOTCH1*, *E2A* y *MYC*. **HSC**: células madres hematopoyéticas; **MMP**: progenitores multipotentes; **CLP**: progenitores linfoides comunes; **ETP**: progenitor temprano de timocitos. Creada a partir de Aifantis et al., 2008.

Considerando todos los trabajos realizados hasta la fecha sobre neoplasias linfoblásticas de células T precursoras, las translocaciones se encuentran entre las alteraciones más frecuentes (afectan a aproximadamente un 50% de los casos con cariotipo anormal). Generalmente esas translocaciones suponen la sobreexpresión de factores de transcripción específicos que pasarían a estar controlados por las regiones reguladoras del receptor de células T (TCR), pero también son frecuentes otras que generan proteínas de fusión con propiedades oncogénicas. También son frecuentes otras alteraciones estructurales como las deleciones 9p21 que afectan al locus *CDKN2A/2B*, y en menor medida las

duplicaciones. Pero también se han descrito mutaciones activantes en oncogenes clave (principalmente *NOTCH1*, y *JAK1*) o mutaciones inactivantes en genes supresores como *FBXW7*, *WT1*, *LEF1*, *ETV6*, *BCL11B*, y varios reguladores epigenéticos (Aifantis *et al.*, 2008; de Leval *et al.*, 2009; Van Vlierberghe y Ferrando, 2012; Neumann *et al.*, 2015) (**Tabla 1**). Todas estas alteraciones genéticas, e incluso los distintos inmunofenotipos de las células neoplásicas que caracterizan estos tumores, son de gran importancia como indicadores de pronóstico y supervivencia. De igual modo, algunos marcadores están relacionados con la aparición de recaídas (Bonn *et al.*, 2013).

Tabla 1. Alteraciones genéticas que definen los diferentes subtipos moleculares de T-ALL. GPR: buena respuesta a la prednisona; **ND:** no determinado. Creada a partir de Vlierberghe y Ferrando, 2012.

Clase de gen	Gen implicado	Reordenamiento genético	Pronóstico	Frecuencia
Miembros de la familia bHLH	<i>TAL1</i>	t(1;14)(p32;q11)	Bueno	3%
		t(1;7)(p32;q34)	Bueno	3%
		Deleción 1p32	Bueno	16%-30%
	<i>TAL2</i>	t(7;9)(q34;q32)	ND	1%
	<i>LYL1</i>	t(7;19)(q34;p13)	ND	1%
	<i>BHLHB1</i>	t(14;21)(q11.2;q22)	ND	1%
Miembros de la familia LMO	<i>LMO1</i>	t(11;14)(p15;q11)	ND	1%
		t(7;11)(q34;p15)	ND	1%
	<i>LMO2</i>	t(11;14)(p13;q11)	ND	6%
		t(7;11)(q34;p13)	ND	6%
	<i>LMO3</i>	Deleción 11p13	ND	3%
		t(7;12)(q34;p12)	ND	<1%
Miembros de la familia Homeobox	<i>TLX1</i>	t(11;14)(p15;q11)	Bueno	5%-10%
	<i>TLX3</i>	t(11;14)(p15;q11)		30%
			Pobre	20%
			Sin impacto	5%
	<i>HOXA</i>	Inv(7)(p15;q34)	Bueno	5%
			ND	3%
	<i>HOXA</i>	t(7;7)(p15;q34)	ND	3%
			ND	3%
	<i>HOXA (CALM-AF10)</i>	t(10;11)(p13;q14)	Pobre	5%-10%
	<i>HOXA (MLL-ENL)</i>	t(11;19)(q23;p13)	ND	1%
	<i>HOXA (SET-NUP214)</i>	Deleción 9q34	Sin impacto	3%
	<i>NKX2.1</i>	Inv(14)(q11.2;q13)	ND	
		Inv(14)(q13;q32.33)	ND	5%
		t(7;14)(q34;q13)	ND	
	<i>NKX2.2</i>	t(14;20)(q11;p11)	ND	1%

Continuación Tabla 1. Alteraciones genéticas que definen los diferentes subtipos moleculares de T-ALL. GPR: buena respuesta a la prednisona; ND: no determinado. Creada a partir de Vlierberghe y Ferrando, 2012.

Clase de gen	Gen implicado	Reordenamiento genético	Pronóstico	Frecuencia
Proto-oncogenes	<i>c-MYB</i>	t(6;7)(q23;q34)	ND	3%
Vía NOTCH1	<i>NOTCH1</i>	t(7;9)(q34;p13)	ND	<1%
		Mutación activante	Bueno	>60%
			GPR	
	<i>FBXW7</i>	Mutación inactivante	Sin impacto	ND
Fallos en el ciclo celular	<i>CDKN2A/2B</i>	Delección 9p21 por metilación	Bueno	70%
	<i>CCND2</i>	t(7;12)(q34;p13)	ND	1%
		t(12;14)(p13;q11)		
	<i>RB1</i>	Delección 13q14	Sin impacto	4%
	<i>CDKN1B</i>	Delección 12p13	ND	2%
Factores de la transcripción y supresores de tumores del crecimiento celular	<i>MYC</i>	t(8;14)(q24;q11)	ND	1%
	<i>WT1</i>	Mutación/delección inactivante	Sin impacto	10%
	<i>LEF1</i>	Mutación/delección inactivante	ND	10%-15%
	<i>ETV6</i>	Mutación/delección inactivante	Sin impacto	13%
	<i>BCL11B</i>	Mutación/delección inactivante	Sin impacto	10%
	<i>RUNX1</i>	Mutación/delección inactivante	Sin impacto	10%-20%
	<i>GATA3</i>	Mutación/delección inactivante	Pobre	5%
Transducción de señales	<i>PTEN</i>	Mutación inactivante	Sin impacto	10%
		Delección 10q23	Pobre	10%
	<i>NUP214-ABL1</i>	Amplificación episoma 9q34	Pobre	4%
			Sin impacto	
	<i>EML1-ABL1</i>	t(9;14)(q34;q32)	ND	<1%
	<i>ETV6-ABL1</i>	t(9;12)(q34;p13)	ND	<1%
	<i>BCR-ABL1</i>	t(9;22)(q34;q11)	Pobre	<1%
	<i>NRAS</i>	Mutación activante	Sin impacto	5%-10%
	<i>NF1</i>	Mutación/delección inactivante	Sin impacto	3%
	<i>JAK1</i>	Mutación activante	Sin impacto	4%-18%
	<i>ETV6-JAK2</i>	t(9;12)(p24;p13)	ND	<1%
	<i>JAK3</i>	Mutación activante	Sin impacto	5%
	<i>FLT3</i>	Mutación activante	Sin impacto	2%-4%
	<i>IL7R</i>	Mutación activante	Sin impacto	10%
Remodelación de la cromatina	<i>EZH2</i>	Mutación/delección inactivante	Pobre	10%-15%
	<i>SUZ12</i>	Mutación/delección inactivante	Sin impacto	10%
	<i>EED</i>	Mutación/delección inactivante	Sin impacto	10%
	<i>PHF6</i>	Mutación/delección inactivante	Sin impacto	20%-40%

3.- La vía JAK-STAT.

Como se puede deducir de la tabla anterior, dos de los genes especialmente afectados por mutaciones (*JAK1* y *JAK3*) pertenecen a la familia de las quinasas *Janus*, y su activación supone también la activación de la vía de señalización JAK-STAT, una vía que se inicia a partir de receptores de citoquinas. La unión de las citoquinas produce unos cambios conformacionales en el receptor y la subsiguiente activación de las proteínas JAKs (asociadas en su región intracelular) mediante autofosforilación y/o transfosforilación. Una vez activadas, las proteínas JAKs fosforilan al receptor permitiendo la unión de los factores transductores y activadores de las señales de transcripción (STATs). Las proteínas STATs unidas al receptor son también fosforiladas por las JAKs permitiendo la formación de homodímeros o heterodímeros que se translocan al núcleo, donde se unen a regiones promotoras de genes clave para activar la expresión de genes implicados en proliferación, regulación de la respuesta inmune e inflamación (**Figura 7**). Se han descrito hasta un total de 40 receptores de citoquinas (de tipo I y II), cuatro quinasas *Janus* (*JAK1-3* y *TYK2*) y siete proteínas STAT (*STAT1-6*) (Shuai y Liu, 2003; Murray, 2007; Liongue y Ward, 2013).

3.1.- La familia de las *Janus* quinasas.

Como se ha comentado, la familia de quinasas *Janus*, está formada por cuatro miembros: *JAK1*, *JAK2*, *JAK3* y la tirosina quinasa 2 (*TYK2*). El gen ancestral de esta familia debió surgir antes de la divergencia entre vertebrados e invertebrados, ya que se han encontrado en los cordados primitivos (*Ciona*). Pero este tipo de cordados tienen un único gen *JAK* al igual que *Drosophila* (Yamaoka *et al.*, 2004; Liongue y Ward, 2013).

En el genoma humano, el gen *JAK2* se encuentra en el cromosoma 9 (9p24) y está formado por 25 exones que dan lugar a una proteína de 1.132 aminoácidos (125 kDa).

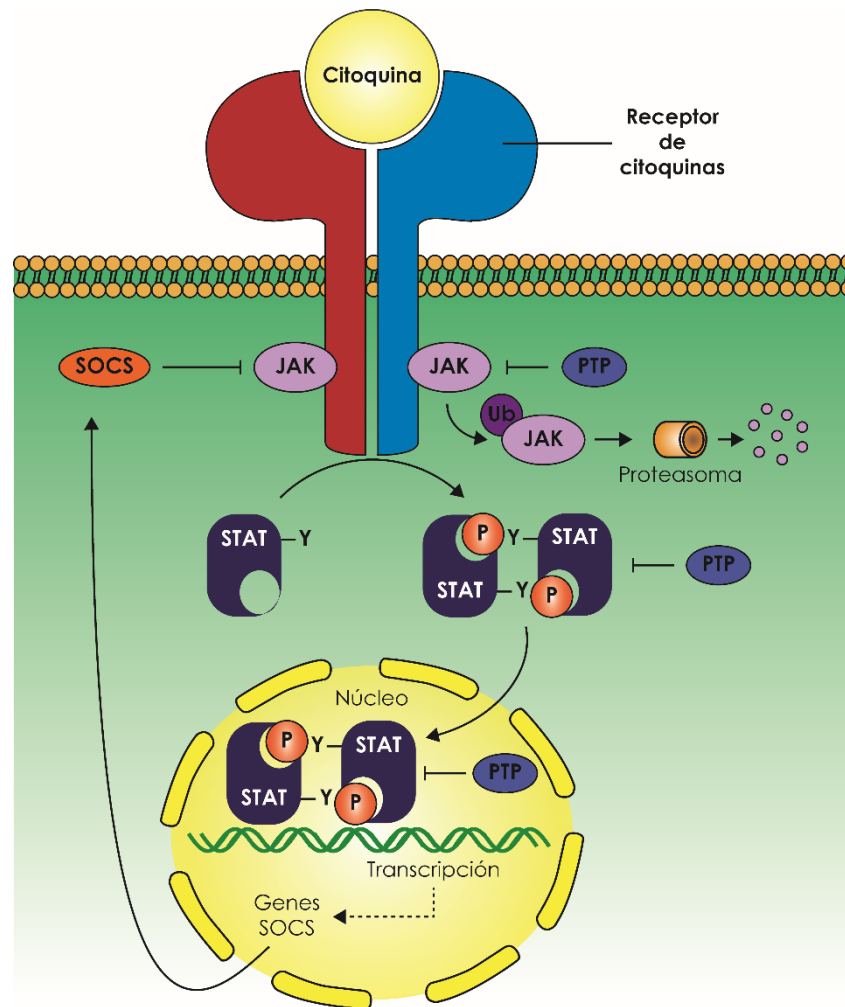


Figura 7. Vía de señalización JAK-STAT. La vía JAK-STAT representa una de las principales vías de señalización por la que las células son capaces de transmitir señales desde los receptores extracelulares al núcleo. La activación de las proteínas JAKs se produce tras la unión de citoquinas a su receptor específico, de modo que, tras una cadena de fosforilaciones las proteínas STATs son fosforiladas, forman dímeros que se translocan al núcleo para activar la transcripción de sus genes diana, entre los que se encuentran los genes SOCS. Las proteínas SOCS, a su vez, actúan como reguladores negativos de la vía junto con otras proteínas (PTPs), y además podrían degradar las proteínas JAKs a través de su poliubiquitinación. Creada a partir de Shuai y Liu, 2003.

Todos los miembros de la familia JAK poseen una estructura general común constituida por siete dominios conocidos como dominios de homología *Janus* (JH), que se numeran del uno al siete desde el extremo carboxilo terminal al amino terminal (**Figura 8**). Los dominios JH5, JH6 y JH7 (extremo amino terminal) forman el dominio FERM por el que las proteínas JAK se unen a los receptores de citoquinas. El dominio SH2 (JH3 y JH4) interacciona con otras proteínas, pero también podría actuar como espaciador y estabilizador del dominio FERM. JH2 es el dominio

pseudoquinasa, que posee gran homología con el dominio quinasa (JH1) que sería el responsable de la actividad catalítica. Sin embargo, el dominio pseudoquinasa ejerce una actividad reguladora negativa sobre el dominio quinasa (Yamaoka *et al.*, 2004; Liongue y Ward, 2013).

Los estudios realizados con ratones deficientes para los cuatro miembros de la familia JAK han demostrado que estas proteínas son esenciales aunque tengan funciones muy específicas (Yamaoka *et al.*, 2004). La pérdida de JAK2 es la más dramática, ya que resulta letal a nivel embrionario debido a un fallo en la eritropoyesis a los 12 días del desarrollo (Neubauer *et al.*, 1998; Krempler *et al.*, 2004).

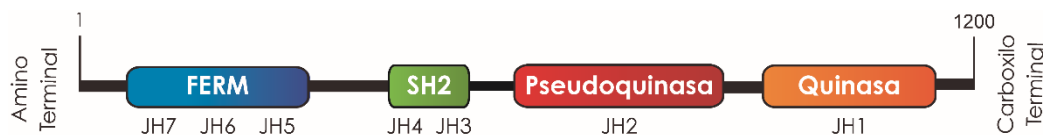


Figura 8. Esquema de la estructura general de las proteínas JAKs. Cada proteína JAK está formada por la repetición de siete dominios de homología JH1-JH7. En el extremo amino el dominio FERM está formado por JH5, JH6 y JH7; el dominio SH2 está formado por JH3 y JH4; el dominio no catalítico pseudoquinasa se corresponde con JH2; y el dominio con actividad catalítica en el extremo carboxilo terminal se corresponde con JH1.

Una vez ha sido activada la vía, cuando las proteínas STATs han inducido la transcripción de sus genes diana, la vía JAK-STAT debe ser apagada para evitar una situación perjudicial para la célula, ya que la activación constitutiva de la vía podría conferir a las células las propiedades características de una célula tumoral. Por ello, la vía JAK-STAT posee múltiples mecanismos encargados de su regulación negativa (Shuai y Liu, 2003; Murray, 2007). Algunos de estos mecanismos se basan en la reducción del número de receptores expuestos en la superficie celular, en la separación de las proteínas JAKs del receptor, o en el transporte de los factores de transcripción STATs fuera del núcleo (Murray, 2007). Sin embargo, hay dos procesos que juegan un papel clave en la regulación negativa de la vía JAK-STAT (Shuai y Liu, 2003; Murray, 2007). Por un lado, la regulación de la fosforilación de las JAKs por parte de algunas fosfatasa de tirosinas (PTPs), como SHP1 y SHP2. Ambas proteínas poseen dos dominios SH2 en tándem en su extremo amino terminal, que serían los encargados de mediar sus interacciones con otras proteínas (He *et al.*, 2014). *SHP1*

se expresa principalmente en células hematopoyéticas, mientras que *SHP2* se expresa ubicuamente, y no se ha observado que tengan papeles redundantes en la regulación de la señalización celular (Shuai y Liu, 2003; Salmond y Alexander, 2006). *SHP1* ejerce su regulación sobre JAK1 y JAK2, mientras que *SHP2* parece actuar tan sólo sobre JAK1, y hay una cierta discrepancia sobre su posible papel en la desfosforilación de las proteínas STATs en el núcleo (Shuai y Liu, 2003; Salmond y Alexander, 2006). Por otro lado, está la familia de las proteínas supresoras de la señalización por citoquinas (SOCS), que son reguladores negativos inducidos por las propias citoquinas. Son genes diana de los factores de transcripción STATs, y constituyen un claro ejemplo de regulación por retroalimentación negativa (Shuai y Liu, 2003; Murray, 2007; He *et al.*, 2014). La familia SOCS está compuesta por ocho miembros: CIS, y SOCS1-7. Todas tienen un dominio SH2 que se encuentra flanqueado por un dominio amino terminal variable, y un dominio caja SOCS en el extremo carboxilo terminal. Sería a través de su dominio SH2 por el que interactúan tanto con las proteínas JAKs como con los receptores de citoquinas a través de sus residuos de tirosinas fosforilados (Alexander, 2002; Shuai y Liu, 2003; Inagaki-Ohara *et al.*, 2013).

Los genes SOCS se expresan con niveles muy bajos en condiciones basales, pero activan rápidamente su transcripción en condiciones de estimulación por citoquinas, en muchos casos de forma dependiente de STATs. Justo entonces ejercerían su inhibición sobre la vía JAK-STAT a través de varios mecanismos. SOCS1 es capaz de unirse directamente por su dominio SH2 a las JAKs fosforiladas inhibiendo directamente su acción. SOCS3 necesita unirse al receptor de citoquinas activo para poder inhibir a las proteínas JAKs, y CIS es capaz de competir con las STATs para unirse al receptor (Alexander, 2002; Shuai y Liu, 2003) (**Figura 7**).

El dominio caja de SOCS es capaz de interactuar con las elonguinas B y C, proteínas que forman parte del complejo de la ubiquitin-ligasa E3. De este modo, las proteínas SOCS son capaces de reclutar la maquinaria encargada de degradar proteínas de la vía JAK-STAT mediante un proceso de poliubiquitinación (Alexander, 2002; Shuai y Liu, 2003; Inagaki-Ohara *et al.*, 2013).

4.- La vía no canónica mediada por JAK.

En 1995 se pudo documentar la presencia de JAK2 en el núcleo de las células de los islotes pancreáticos (Sorenson y Stout, 1995), y un año más tarde en las células CHO (*Chinese Hamster Ovary* derivadas de ovario de hámster chino) y en hepatocitos de rata. Además, parece ser que no sólo JAK2, sino también JAK1, son capaces de pasar al núcleo celular incluso en condiciones de privación (Lobie *et al.*, 1996). En 2009, el grupo del Dr. Kouzarides (Dawson *et al.*, 2009) volvió a demostrar que JAK2 era capaz de ir al núcleo y fosforilar a la tirosina 41 (Y41) de la histona H3, desplazando a la proteína HP1 α . HP1 α es una proteína de unión a la cromatina que permite el silenciamiento transcripcional, y una de las consecuencias del desplazamiento de HP1 α es la creación de un cuadro de inestabilidad genética y el aumento de expresión de algunos oncogenes como *LMO2* (Dawson *et al.*, 2009; Shih *et al.*, 2012). Esta nueva función de las proteínas JAKs consistiría en una nueva vía no canónica, aunque aún se desconoce el mecanismo por el cual JAK1 y JAK2 entran en el núcleo, puesto que no tienen señales de localización nuclear (Shih *et al.*, 2012).

5.- Alteraciones de la vía JAK-STAT en tumores hematológicos.

La vía de señalización JAK-STAT juega un papel esencial en la proliferación, supervivencia y diferenciación de los precursores linfoides (Murray, 2007). Por consiguiente no es de extrañar que se haya encontrado alterada en muchos tipos de neoplasias hematológicas (Vainchenker y Constantinescu, 2013). De hecho, muchos autores han descrito mutaciones activantes en T-ALLs que afectan principalmente a dos miembros de las quinasas *Janus*, *JAK1* (4-18%) y *JAK3* (5%) (Flex *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2008; Asnafi *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Sin embargo, llama poderosamente la atención la escasa importancia que se ha otorgado a *JAK2* en el desarrollo de las leucemias/linfomas linfoblásticos T (T-ALL y T-LBLs), a pesar de que uno de los primeros casos de señalización aberrante de esta vía fue descrito en un caso de T-ALL debido a una translocación t(9;12)(p24;p13) que resultaba en la activación constitutiva de una oncoproteína de fusión TEL-JAK2 (Lacronique *et al.*, 1997). El descubrimiento de mutaciones activantes de *JAK2* en otras neoplasias hematológicas, como las mieloproliferativas (Baxter *et al.*, 2005;

Kralovics *et al.*, 2005), ha realzado aún más la importancia de JAK2. Entre las mutaciones que afectan a este gen destaca en particular una mutación de ganancia de función encontrada en un paciente con policitemia vera, consistente en la sustitución de valina por fenilalanina en el dominio pseudoquinasa que producía una proteína con actividad constitutiva (James *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005; Jamieson *et al.*, 2006). Aparte de las mutaciones de JAK2 encontradas en síndromes mieloproliferativos, otros estudios han descrito mutaciones en pacientes con leucemias linfoblásticas agudas, generalmente asociadas al síndrome de Down (Bercovich *et al.*, 2008; Mullighan, Zhang *et al.*, 2009).

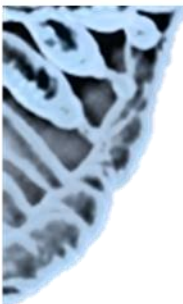

En cuanto a los reguladores negativos de la vía, cabría destacar que algunos supresores de señalización por citoquinas de la familia SOCS se han encontrado silenciados en muchos tipos de tumores, incluidas neoplasias linfoblásticas de células B, mediante la hipermetilación de sus islas CpG en las regiones promotoras (Yoshimura *et al.*, 2007; Inagaki-Ohara *et al.*, 2013; Vainchenker y Constantinescu, 2013). Pero, como el caso del gen JAK2, el papel de estos reguladores en el desarrollo de los T-LBLs no ha sido aún determinado.



Objetivos

El objetivo general de esta tesis ha sido determinar la contribución de JAK2 y sus inhibidores al desarrollo de los linfomas linfoblásticos de células T precursoras (T-LBL). Para ello el trabajo se ha desarrollado en tres objetivos específicos:

1. La identificación de mutaciones activantes, cromosómicas y/o puntuales o génicas, y el análisis del significado funcional de las mismas mediante ensayos *in vitro ad hoc*.
2. El análisis de la posible expresión aberrante de los principales reguladores negativos (SHP1, SOCS1 y SOCS3) afectados en otras neoplasias, y de los cambios epigenéticos implicados en su inactivación.
3. El estudio de la contribución de las mutaciones de JAK2 al desarrollo de este tipo de linfomas a través de la vía no-canónica.



Materiales y Métodos

1.- Material de trabajo.

1.1.- Biopsias humanas.

Se han analizado 16 linfomas linfoblásticos de células T precursoras (ocho procedentes de pacientes adultos y ocho pediátricos), además de cuatro timos fetales sin patologías conocidas. Las muestras se obtuvieron a través de diferentes biobancos de tumores integrados en la Red Española de Biobancos de Hospitales (RetBioH; www.redbiobancos.es) ([Tabla Suplementaria 1](#)), previo consentimiento informado y conforme a las normas legales de los estudios clínicos en España y a las reglamentaciones de los comités de ética de los respectivos hospitales de procedencia (Referencia: CEI 31-773): Hospital Universitario 12 de Octubre i+12 (#226 y #829), Hospital Universitario Ramón y Cajal-IRYCIS (#346), Hospital Virgen de la Salud (#188 y #192), Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (#521), Hospital General Universitario Gregorio Marañón (#038, #080, #135, #154, #460 y #685), Hospital La Paz (#238 y #408) y Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (#516 y #734). Las muestras fueron clasificadas según los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud para las neoplasias linfoides y las recomendaciones posteriores (Swerdlow *et al.* (Eds.), 2008). En algunos casos se analizaron marcadores adicionales en nuestro laboratorio para mejorar la subclasificación de los T-LBLs ([Tabla Suplementaria 1](#)).

1.2.- Líneas celulares.

Durante la realización de esta tesis doctoral se han utilizado una serie de líneas celulares tanto humanas como de ratón:

- Las células adherentes HEK-293T (células humanas embrionarias de riñón) fueron adquiridas en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Manassas, VA, EE.UU).
- La línea celular γ 2A, derivada de una línea de fibrosarcoma humano y deficiente para la proteína JAK2, fue generosamente cedida por la Dra. Ana Costa Pereira (Imperial College London, UK).

- La línea BaF3-EpoR, derivada de una leucemia murina proB, fue generosamente cedida por el Dr. David M. Weinstock (Dana Farber Cancer Institute, EE.UU), y por el Dr. Charles Mullighan (St. Jude Research, EE.UU). Esta línea es dependiente de interleuquina 3 (IL3) y expresa de manera estable el receptor de eritropoyetina (EpoR) de ratón.
- Las líneas celulares humanas Jurkat y Molt-4, derivadas de leucemias/linfomas linfoblásticos T, fueron adquiridas de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ; Braunschweig, Alemania).

1.2.1.- Cultivos celulares.

Las líneas celulares adherentes (HEK-293T y γ 2A) fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EE.UU) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) descomplementado (PAA Laboratories, GE Healthcare Life Sciences; Vélizy-Villacoublay, Francia) y 2 mM de L-glutamina (Merck KGaA; Darmstadt, Alemania). En el caso de las células γ 2A, además se suplementó el medio con 400 μ g de Higromicina (G418) (Sigma; San Luis, MO, EE.UU).

Las líneas celulares en suspensión (Jurkat, Molt-4 y BaF3-EpoR) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con un 10% de FBS descomplementado (PAA Laboratories) y 2 mM de L-glutamina (Merck KGaA). En el caso de las células Molt-4, además se suplementó el medio con 1 mM de piruvato sódico (Merck KGaA), y en el caso de las células BaF3-EpoR con 10 U/ml de Epo (R&D Systems; Minneapolis, MN, EE.UU).

Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera húmeda y con un contenido del 5% de CO₂.

1.2.2.- Tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina (AZA) y Tricostatina A (TSA).

Las líneas celulares Jurkat y Molt-4 fueron tratadas con una dosis de 5-aza-2'-desoxicitidina (AZA) (Sigma) de 2.5 μ M durante 72 horas, con recambio del medio y de la droga cada 24 horas. Este agente demetilante posee la capacidad de inhibir la actividad catalítica de las ADN metiltransferasas (DNMTs) permitiendo la reducción del contenido de metilación del ADN, y por tanto, potenciando la expresión de aquellos genes metilados.

También se trataron ambas líneas celulares con el inhibidor de deacetilasas tricostatina A (TSA) (Sigma), compuesto que revierte el estado de represión transcripcional mediado por la deacetilación de histonas. Este tratamiento se añadió a las células durante 24 horas en una dosis de 1 μ M. Además, se realizó un tratamiento combinado con ambas drogas, de modo que primero se cultivaron durante 72 horas en presencia de AZA 2.5 μ M (recambio del medio y de la droga cada 24 horas) y en las últimas 24 horas se añadió al cultivo TSA 1 μ M.

1.3.- Plásmidos y construcciones.

El vector *pcDNA3* (Invitrogen; Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU) que contiene la proteína de fusión TEL-JAK2 fue generosamente cedido por el Dr. Olivier Bernard del Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale (Francia).

El ADNc de JAK2 humano se clonó en el vector *pGEM^R-T Easy* (Promega; Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU) mediante una ligación a 4 °C durante toda la noche, utilizando el tampón *2x Rapid Ligation Buffer*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Previamente, el ADNc fue amplificado con unos cebadores específicos y purificado ([Tabla Suplementaria 2](#)). Después, la construcción *pGEM^R-T Easy-JAK2* fue digerida con la enzima de restricción *NotI* (Roche Applied Science; Basilea, Suiza) para el subclonaje del ADNc al vector *pcDNA3* (Invitrogen), y se realizaron las reacciones de transformación utilizando las bacterias competentes DH5 alpha. Las recombinantes positivas se seleccionaron por digestión con *NotI* (Roche Applied Science) y secuenciación.

La construcción luciferasa pGL4.52 [*luc2P/STAT5 RE/Hygro*] (Figura 9) que contiene cinco copias de elementos de respuesta a STAT5 fue adquirida en la casa comercial Promega. El vector pCMV6-XL4-STAT5A que contiene el ADNc completo de STAT5A fue adquirido en OriGene (Rockville, MD, EE.UU).

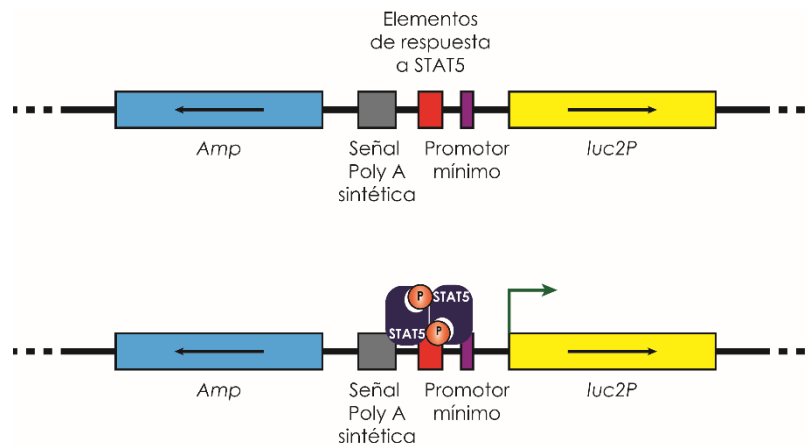


Figura 9. Esquema de la construcción pGL4.52 [*luc2P/STAT5 RE/Hygro*]. La imagen superior muestra una parte del vector luciferasa pGL4.52 [*luc2P/STAT5 RE/Hygro*] empleado para estimar la activación de STAT5. De izquierda a derecha aparecen: el gen de resistencia a Ampicilina (**Amp**), una señal Poly A sintética, cinco copias de elementos de respuesta a STAT5, un promotor mínimo y el gen reportero luciferasa (**luc2P**). La imagen inferior muestra como la unión de dímeros de STAT5 promueve la transcripción del gen reportero luciferasa.

2.- Análisis de ADN.

2.1.- Extracción de ADN.

El ADN de las biopsias humanas fue extraído con el reactivo *TripureTM* (Roche Applied Science) siguiendo las especificaciones del fabricante. En el caso de las líneas celulares Jurkat y Molt-4 se empleó el kit *QIAamp^R DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU) siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de ADN se determinó usando un espectrofotómetro *Thermo Scientific NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific).

2.2.- Modificación del ADN con bisulfito sódico.

El ADN extraído se sometió a modificación con bisulfito sódico (BS). Con este tratamiento, las citosinas no metiladas sufren una desaminación oxidativa transformándose en uracilo. Para realizar esta conversión se partió de 500 ng del ADN genómico de las muestras de T-LBLs humanas, o de las células Jurkat y Molt-4, empleando el kit *EZ DNA Methylation-Gold™* (Zymo Research; Orange, CA, EE.UU), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.3.- Reacción en Cadena de la Polimerasa Específica de Metilación (MSP).

Para obtener una información cualitativa del estado de metilación de los promotores de los genes *SHP1*, *SOCS1* y *SOCS3*, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica de metilación (MSP) para cada uno de los promotores. La MSP es una técnica que permite diferenciar de una forma general secuencias metiladas de las no metiladas tras una modificación previa con BS (Herman *et al.*, 1996). Dicha técnica se basa en dos reacciones de PCR independientes; una llevada a cabo con una pareja de cebadores que hibridan únicamente con la secuencia molde metilada (**M**) y otra con los cebadores para la misma secuencia pero en estado demetilado (**U**).

Los cebadores ([Tabla suplementaria 2](#)) fueron diseñados mediante el programa *Methyl Primer Express® Software v1.0* (Applied Biosystems; Foster City, CA, EE.UU). Las PCRs se realizaron en un volumen final de 25 µl, con cebadores específicos 0.2 mM, tampón 1x, MgCl₂ 15 mM, dNTP 0.2 µM y 1 U de Taq polimerasa *IMMOLASE DNA* (Bioline; Londres, UK) y 1 µl de ADN modificado con BS.

Como controles, se utilizaron una muestra de agua (control de contaminación), una muestra de ADN metilado *in vitro* (**IVD**, control de metilación) y una muestra de linfocitos normales (**NL**, un tipo celular que por lo general no suele presentar metilación, control de no metilación). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio como agente intercalante.

Para la obtención del control IVD, se trató el ADN procedente de linfocitos normales con S-adenosil metionina (SAM) (New England Biolabs; Ipswich, MA, EE.UU), tampón NE 10x (New England Biolabs) y enzima SssI Metilasa (New England Biolabs) según las condiciones indicadas por el distribuidor. El ADN resultante se purificó, se modificó mediante tratamiento con BS y se utilizó como muestra control de metilación para las MSPs.

2.4.- Secuenciación Genómica de ADN modificado con bisulfito sódico.

Tras modificar el ADN con BS, se amplificó la zona de interés mediante una PCR utilizando cebadores diseñados mediante el programa *Methyl Primer Express^R Software v1.0* (Applied Biosystems). A diferencia de los empleados para la técnica de MSP, por lo general, estos cebadores no hibridan con ningún dinucleótido CpG, por lo que independientemente del estado de metilación siempre se alcanzará amplificación del ADN. Las secuencias génicas amplificadas se separaron en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio como agente intercalante y las bandas correspondientes, según criterio de tamaño, se extrajeron del gel mediante el kit comercial *illustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Life Sciences). A continuación, los ADNs purificados se ligaron en el vector de clonación *pGEM^R-T Easy* mediante ligasa T4 (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y como ya se indicó anteriormente. Las bacterias recombinantes positivas fueron seleccionadas por exploración del color (colonias blancas-azules), y los insertos se secuenciaron en un secuenciador ABI377 (Applied Biosystems). Finalmente, las secuencias correspondientes de los insertos clonados se analizaron mediante el programa *BioEdit V7.0.9* (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html).

2.5.- Pirosecuenciación.

La confirmación de las mutaciones identificadas en el ADNc del gen *JAK2* y de los datos de densidad de metilación del promotor de *SOCS3* se realizó mediante pirosecuenciación. Esta técnica de secuenciación se basa en la cuantificación a tiempo real de la señal luminosa generada por la degradación

enzimática del pirofosfato liberado durante la incorporación de nucleótidos. Concretamente, la amplificación de un fragmento de ADN por unión secuencial de nucleótidos tras la hibridación de un cebador específico libera grupos pirofosfato. Dichos grupos son utilizados como sustrato por la enzima sulforilasa para la generación de ATP, que transforma la señal luciferasa en luz. Por ello, el número de nucleótidos incorporados a la secuencia patrón es proporcional a los fotones generados y dicha información es interpretada y transformada por un software en un picograma, en el cual, la altura del pico es proporcional al número de nucleótidos incorporados. Los nucleótidos no incorporados son degradados sin generación de luz por la enzima apirasa.

Previo a la pirosecuenciación, en el caso de los estudios de metilación, las muestras fueron modificadas con BS como se indicó en apartados previos.

Los cebadores específicos utilizados en las reacciones de pirosecuenciación ([Tabla Suplementaria 2](#)) fueron diseñados con el programa *PyroMart Assay Design* v2.0.01.15 (Qiagen), y las reacciones se llevaron a cabo mediante el sistema *PyroMark Q24* (Qiagen) con los reactivos correspondientes. Estos análisis fueron realizados por el Dr. Agustín F. Fernández, en el laboratorio del Dr. Mario F. Fraga (Hospital Universitario, Universidad de Oviedo).

3.- Análisis de ARNm.

3.1.- Extracción de ARN.

El ARN total procedente de cultivos celulares y biopsias humanas fue extraído con el reactivo *Tripure™* (Roche Applied Science). La integridad del ARN extraído se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con formaldehído, y su calidad se estimó por el valor de Integridad (RIN) obtenido mediante el sistema *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, EE.UU) en el servicio de genómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) o el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría en un *Thermo Scientific NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific).

3.2.- Identificación de la translocación TEL-JAK2.

Para identificar la translocación TEL-JAK2 se realizó una transcripción inversa a partir del ARN de todas las biopsias humanas empleando el kit *SuperScript™ First-Strand Syntesis System for RT-PCR* (Invitrogen). A partir del ADNc de las muestras se amplificó un fragmento de 296 pares de bases, que cubre la región de rotura del gen de fusión, con unos cebadores específicos (Romana *et al.*, 1995; Lacronique *et al.*, 1997) ([Tabla Suplementaria 2](#)). Las reacciones de amplificación (PCR) se llevaron a cabo con la polimerasa *IMMOLASE DNA* (Bioline). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio como agente intercalante.

Como control positivo para la amplificación por PCR se realizó una transfección transitoria en células HEK-293T con el vector pcDNA3-TEL-JAK2 utilizando el reactivo *Lipofectamine Reagent* (Invitrogen), y 24 horas después se extrajo el ARN que se sometió a las mismas condiciones que el ARN de los tumores.

3.3.- Búsqueda de mutaciones del gen JAK2.

La búsqueda de mutaciones en JAK2 se realizó inicialmente en muestras de ADNc generadas mediante transcripción inversa con el kit *SuperScript™ First-Strand Syntesis System for RT-PCR* (Invitrogen).

Se amplificó una región específica del gen (*hot spot*) que comprendía desde el exón 12 hasta el exón 16 utilizando el kit *FastStart High Fidelity PCR System* (Roche Applied Science) y una pareja de cebadores específicos ([Tabla Suplementaria 2](#)). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio como agente intercalante, se purificaron utilizando el método *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) y se secuenciaron utilizando parejas adicionales de cebadores específicos ([Tabla Suplementaria 2](#)) que permitían secuenciar la totalidad del fragmento amplificado. Los resultados de secuenciación fueron analizados con el programa *Chromas Pro* (technelysium.com.au/) y alineados con *BioEdit* (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/).

bioedit.html) tomando como referencia la secuencia del gen JAK2 de ENSEMBL (ENST00000381652) (www.ensembl.org/).

Los productos de PCR cuya secuencia no pudo ser interpretada correctamente, fueron clonados en el vector *pGEM^R-T Easy* (Promega) y procesados (como se ha indicado con anterioridad) para obtener 20 clones positivos por muestra que se mandaron a secuenciar.

3.4.- RT-PCR cuantitativa a tiempo a real.

Los niveles de expresión transcripcional de los genes *JAK2*, *LMO2* y *SOCS3* se determinaron a partir de 500 ng de ARN mediante qRT-PCR utilizando primero el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche Applied Science), y posteriormente se amplificó el ADNc utilizando el kit *LightCycler^R DNA FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Applied Science). Como control interno y de referencia se amplificó el ADNc correspondiente al gen que codifica para la proteína Beta-2 microglobulina (*B2-M*). Los cebadores específicos para cada gen se indican en la Tabla Suplementaria 2. Todas las reacciones se repitieron tres veces para cada muestra, y los niveles de expresión se calcularon mediante la cuantificación relativa de los valores umbral de ciclo (*Ct*) por el método 2 delta-delta *Ct*, que expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores *Ct* de la muestra problema y los valores *Ct* de la muestra control (Livak y Schmittgen, 2001).

4.- Análisis de proteínas.

4.1.- Extracción de proteínas.

Los lisados de proteínas procedentes de células o de las biopsias humanas se obtuvieron mediante la utilización del tampón de lisis RIPA (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 0.5% Ácido deoxicólico, 0.1% SDS, y Tritón X-100), suplementado con 100 mM PMSF y las cantidades recomendadas de inhibidores de fosfatasa e inhibidores de proteasas (Sigma). La concentración proteica de los extractos se determinó utilizando el método colorimétrico *BCATM Protein Assay*

(Thermo Fisher Scientific) utilizando diluciones seriadas de la albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) como curva de calibración.

4.2.- Western blot.

Las proteínas previamente purificadas se ajustaron a una concentración de 10 µg y se resuspendieron en tampón de carga (6.5% SDS, 25% glicerol, 2 M 2-mercaptoetanol, 0.02% azul de bromofenol, 0.25 M Tris-HCl pH 6.8), y se incubaron cinco minutos a 100 °C. Posteriormente, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 8% (porcentaje adecuado para los tamaños de las proteínas a analizar) en presencia de SDS (desnaturalizante). Tras la separación de las muestras se realizó una transferencia húmeda a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad; Hercules, CA, EE.UU) durante dos horas a 300 mA y 4 °C. Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon en agitación utilizando una solución de leche al 5% en tampón T-TBS (100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5 y 0.1% Tween-20) durante una hora a temperatura ambiente y, a continuación, se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes a las proteínas de los genes *JAK2* y *STAT5* diluidos en T-TBS durante toda la noche a 4 °C en agitación. Los anticuerpos para las proteínas α -Tubulina o β -Actina, se utilizaron como control de carga. Seguidamente, y tras realizar una serie de lavados, se incubaron las membranas con los correspondientes anticuerpos secundarios contra ratón y contra conejo, según correspondiera, acoplados a la peroxidasa de rábano (HRP) y ambos de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU). La detección de las proteínas marcadas por los anticuerpos se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia *WesternBright ECL* (Advansta; Menlo Park, CA, EE.UU), y su visualización mediante el sistema *ImageQuant LAS 4000*. (GE Healthcare Life Sciences).

Los anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección fueron los siguientes:

- Anticuerpo monoclonal contra *JAK2* (D2E12) (Cell Signaling Technology), dilución 1:1000.

- Anticuerpo monoclonal contra fosfo-JAK2 Tyr1007/1008 (C80C3) (Cell Signaling Technology), dilución 1:1000.
- Anticuerpo policlonal contra STAT5 (Cell Signaling Technology), dilución 1:5000.
- Anticuerpo monoclonal contra fosfo-STAT5 (pY694) (BD Biosciences; San Jose, CA, EE.UU), dilución 1:1000.
- Anticuerpo monoclonal contra α -Tubulina (DM1A) (Sigma), dilución 1:10000.
- Anticuerpo monoclonal contra β -Actina (AC-15) (Sigma), dilución 1:5000.

4.3.- Inmunoprecipitación.

Para analizar los niveles de fosforilación de SOCS3 (pSOCS3) dado que no existe ningún anticuerpo comercial capaz de detectar la forma fosforilada de dicha proteína, se realizó la precipitación de la proteína SOCS3 y posteriormente la inmunodetección con un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas. Para este ensayo se utilizaron las células γ 2A y BaF3-EpoR. Las células γ 2A fueron transfectadas transitoriamente con las construcciones pcDNA3-JAK2, pcDNA3-JAK2-H574R y pcDNA3-JAK2-R683G utilizando el reactivo *siLentFect™ Lipid Reagent* (Bio-Rad). En el caso de las células BaF3-EpoR se utilizaron las líneas seleccionadas y estables para las construcciones pEZ-Lv201 con JAK2 normal o mutado.

Los extractos proteicos de las células obtenidos mediante lisis con tampón RIPA e inhibidores de proteasas y fosfatasa fueron cuantificados e inmunoprecipitados mediante la utilización de bolas magnéticas (*Dynabeads®*) (Thermo Fisher Scientific) con proteína G. Para ello se incubaron los extractos proteicos con el anticuerpo policlonal contra SOCS3 (ab3693) (Abcam; Cambridge, UK) conjugado con las bolas magnéticas para formar los complejos anticuerpo-antígeno siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez realizada la separación, se prepararon los extractos inmunoprecipitados para su separación en geles de gradiente de poliacrilamida (4-15%) en condiciones no

desnaturalizantes. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal contra tirosinas fosforiladas (4G10) (Upstate Biotechnology; Lake Placid, NY, EE.UU), seguido del anticuerpo secundario contra ratón *TrueBlot[®] ULTRA* (Rockland; Limerick, PA, EE.UU).

4.4.- Inmunofluorescencia.

El estudio de la distribución sub-celular y expresión de la proteína JAK2 en cultivos celulares se realizó mediante inmunofluorescencia (IF) simple indirecta. Para ello se emplearon las células γ 2A, que fueron adheridas a cristales sin tratar, pero esterilizados previamente. Una vez adheridas fueron transfectadas transitoriamente utilizando el reactivo *siLentFect[™] Lipid Reagent* (Bio-Rad) y la construcción pcDNA3-JAK2 (normal o mutado); o bien se co-transfectaron con los vectores pcDNA3-JAK2 y el vector *pCMV6-XL4-STAT5A*.

La inmunofluorescencia se comenzó 24 horas después de la transfección y tras un lavado con tampón fosfato salino con BSA (PBS-BSA) al 0.1%. A continuación, se realizó una fijación con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente, y tras varios lavados con PBS-BSA 0.1%, se permeabilizaron las células con una solución de PBS-triton x100 al 0.1% durante 10 minutos. Posteriormente, se aplicó una solución de bloqueo de PBS-BSA 3%, y tras 30 minutos, se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario monoclonal contra JAK2 (D2E12) (Cell Signaling Technology) diluido en PBS-BSA 1%. Para su detección se utilizó un anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa Flúor 488 diluido en PBS-BSA 1%, incubándolo simultáneamente con la tinción nuclear TO-PRO-3, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, para el montaje de las muestras se empleó Mowiol.

Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal LSM510 (Zeiss; Jena, Alemania) y procesadas utilizando el programa gratuito *Fiji-Image J* (fiji.sc/Fiji).

4.5.- Inmunohistoquímica.

Los niveles de expresión y localización celular de la proteína JAK2 fueron detectados mediante inmunohistoquímica (IH) en secciones congeladas de tejido fresco de los tumores #238 y #460. Para llevar a cabo la inmunotinción se realizó una fijación de las secciones en formol al 10% (Sigma). A continuación, y tras varios lavados con PBS-T (PBS con 0.1M Tween-20), se incubaron 30 minutos en peróxido de hidrógeno al 3% en PBS-T, para eliminar la peroxidasa endógena. Seguidamente, se aplicó la solución *Dako Antibody Diluent* (Dako; Hamburgo, Alemania) durante 30 minutos, con la finalidad de bloquear las posibles uniones inespecíficas entre el anticuerpo y el tejido. Para las diluciones de los anticuerpos primario y secundario se utilizó la misma solución de bloqueo. Para la detección de JAK2 se incubaron las secciones con el anticuerpo monoclonal contra JAK2 (D2E12) (Cell Signaling Technology) durante toda la noche a 4 °C. Como método de visualización se empleó un anticuerpo secundario policlonal contra conejo, conjugado con HRP (Dako) y se reveló con *Liquid DAB+Substrate Chromogen System* (Dako). A continuación, se realizó una contratinción con hematoxilina de Mayer (Sigma), seguida de una deshidratación mediante un gradiente ascendente de alcoholes. Finalmente, tras varios pases en xilol (Sigma), se procedió al montaje con DPX (Sigma).

Las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color, y procesadas utilizando el programa gratuito *Fiji-Image J* (fiji.sc/Fiji).

5.- Ensayos funcionales.

5.1.- Generación de mutantes de JAK2 mediante mutagénesis dirigida.

Los mutantes pcDNA3-JAK2-E549K, pcDNA3-JAK2-K558R, pcDNA3-JAK2-H574R, pcDNA3-JAK2-L634P, pcDNA3-JAK2-I682T, y pcDNA3-JAK2-R683G fueron generados a partir del plásmido pcDNA3-JAK2 mediante mutagénesis dirigida utilizando el kit *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies). Para ello se realizaron amplificaciones por PCR con cebadores específicos ([Tabla Suplementaria 2](#)) diseñados a través del programa de diseño de

oligonucleótidos disponible en la web de Agilent Technologies (www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp).

Para generar los mutantes pEZ-Lv201-JAK2-H574R y pEZ-Lv201-JAK2-R683G se adquirió el vector pEZ-Lv201-JAK2 que contiene el ADNc completo de JAK2 humano en la casa comercial Genecopoeia (Rockville, MD, EE.UU), además se adquirió el vector vacío pEZ-Lv201 como control. Ambos mutantes se generaron por reacciones de PCR con el kit de mutagénesis *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies) con los cebadores mencionados anteriormente.

5.2.- Ensayos luciferasa.

Para la realización de los ensayos luciferasa se emplearon las células γ 2A. Las células se sembraron en placas de 12 pocillos y al día siguiente se realizaron las co-transfecciones transitorias con las construcciones pcDNA3-JAK2 (normal o mutado) o pcDNA3 vacío, junto con el vector pCMV6-XL4-STAT5A, y el vector pGL4.52 [*luc2P/STAT5 RE/Hygro*] utilizando el reactivo *siLentFect™ Lipid Reagent* (Bio-Rad). En todos los casos las células fueron también transfectadas con un vector *pRL-TK (Renilla Luciferase Control Reporter Vector)* (Promega) para normalizar los resultados. Transcurridas 24 horas las células fueron lisadas con el tampón de lisis PLB (*Passive Lysis Buffer*) (Promega) y se realizaron las mediciones de la actividad luciferasa y *Renilla* utilizando el sistema *Dual-Luciferase^R Reporter Assay System* (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de luminiscencia se monitorizaron en un luminómetro *Sirius* para tubos (Berthold; Munich, Alemania). La actividad luciferasa se determinó como la razón luciferasa/*Renilla*, y normalizada con respecto a la actividad del vector pcDNA3 vacío.

5.3.- Ensayos de proliferación y viabilidad.

Para realizar los ensayos de proliferación se emplearon las células BaF3-EpoR, transfectadas de manera estable con las construcciones pEZ-Lv201, pEZ-Lv201-

JAK2, pEZ-Lv201-JAK2-H574R y pEZ-Lv201-JAK2-R683G. Las células fueron transducidas con partículas lentivirales generadas en las células empaquetadoras HEK-293T a partir de las diferentes construcciones pEZ-Lv201. Posteriormente, las células estables GFP (proteína fluorescente verde) positivas fueron seleccionadas mediante *sorting* (FACSCVantage SE; BD Biosciences) para obtener unas líneas estables con niveles equivalentes de expresión.

Las células seleccionadas y estables para cada una de las construcciones fueron lavadas en medio sin Epo (R&D Systems), y se sembraron en ausencia de citoquina a una densidad de 1×10^5 células/ml en placas de 12 pocillos y por triplicado. Cada 24 horas y durante cuatro días se realizó el recuento de las células viables mediante exclusión por el colorante vital azul tripan con el contador automático TC10™ Automated Cell Counter (Bio-Rad).

5.4.- Activación de la vía JAK-STAT en las células BaF3-EpoR estables.

Se sembraron 1×10^7 de células BaF3-EpoR seleccionadas y estables para las construcciones pEZ-Lv201-JAK2, pEZ-Lv201-JAK2-H574R y pEZ-Lv201-JAK2-R683G en medio sin Epo (R&D Systems) por duplicado. Se mantuvieron en cultivo sin Epo (R&D Systems) durante 24 horas, y tras este tiempo uno de los duplicados se estimuló con 1 U/ml de Epo (R&D Systems) durante 20 minutos, después todas las células fueron lisadas para la obtención de proteínas con el tampón de lisis RIPA.

6.- Análisis Estadístico.

Para comprobar que los grupos de datos se ajustaban a la normalidad, se empleó el test de Saphiro-Wilk, y para comprobar la homogeneidad de las varianzas se utilizó el test de Levene. El test estadístico fue realizado con el programa R. Las diferencias significativas en las comparaciones entre datos fueron determinadas utilizando una prueba t de student con una corrección por Bonferroni para comparaciones múltiples. Este test estadístico se ha llevado a cabo utilizando el programa SPSS (SPSS Inc., versión 16; Chicago, IL, EE.UU).



Resultados



1.- Una muestra de T-LBL primario humano presenta una translocación TEL-JAK2 t(9;12)(p24;p13).

El análisis de las 16 muestras de T-LBLs humanos ([Tabla Suplementaria 1](#)) nos permitió identificar un solo caso con una translocación TEL-JAK2 similar a la que se había encontrado en algunos casos de T-ALL y en pacientes con leucemia mieloide crónica (CML) atípica (Lacronique *et al.*, 1997). Para la identificación de la translocación TEL-JAK2 se partió de ARN procedente de los linfomas primarios realizándose una retro-transcripción para amplificar el ADNc con una pareja de cebadores específicos, uno de ellos correspondiente al dominio de oligomerización del gen *TEL* (que codifica para un factor de transcripción de la familia ETS) y el otro al dominio quinasa del gen *JAK2* ([Tabla Suplementaria 2](#)). Los fragmentos amplificados se compararon con un control positivo procedente de unas células HEK-293T transfectadas con un vector *pcDNA3* que contiene la translocación t(9;12)(p24;p13) más frecuente ([Figura 10](#)). De las 16 muestras analizadas sólo un paciente adulto y con un linfoma linfoblástico ProT (#829) presentó la translocación.

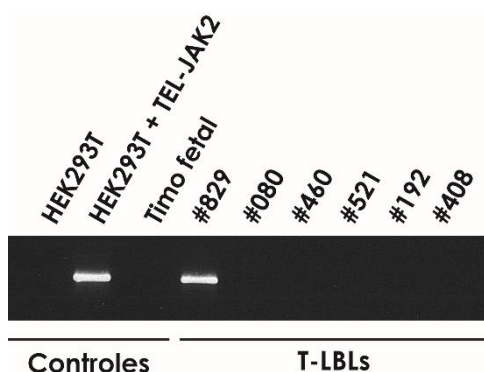


Figura 10. Amplificación por PCR de la translocación t(9;12)(p24;p13). En la parte de la izquierda se muestran los controles negativos (HEK-293T y un timo fetal) y un control positivo (HEK-293T transfectadas con la translocación TEL-JAK2). En la parte de la derecha aparecen seis tumores representativos, de los cuales únicamente el tumor #829 dio positivo para la amplificación con los cebadores que cubren el punto de rotura.

A juzgar por el tamaño de la amplificación (que coincide con el obtenido en las células HEK-293T transfectadas con la translocación descrita por Lacronique en 1997), el gen de fusión estaría compuesto por el dominio de oligomerización de TEL y el dominio quinasa de JAK2 (JH1), careciendo de los dominios FERM, SH2 y pseudoquinasa de JAK2, y así evitar el efecto inhibitorio de este último ([Figura 11](#);

véase también la **Figura 8** para consultar la estructura completa de la proteína JAK2).

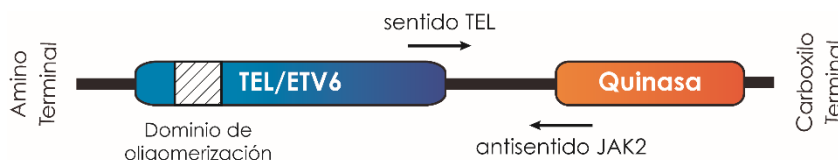


Figura 11. Esquema de la proteína de fusión originada por la translocación $t(9;12)(p24;p13)$. La translocación TEL-JAK2 está formada por el dominio de oligomerización del factor de transcripción TEL, en su extremo amino terminal, y por el dominio quinasa de JAK2 en su extremo carboxilo terminal. La amplificación mediante PCR se realizó con una pareja de cebadores (flechas), donde el cebador sentido amplifica desde la región 3' del dominio de oligomerización de TEL, y el cebador antisentido amplifica a partir de la región 5' que codifica el dominio quinasa de JAK2.

Dado que diferentes estudios coinciden en que esta translocación genera una proteína de fusión con actividad quinasa constitutiva, se determinaron los niveles de expresión de la proteína STAT5 fosforilada en su residuo tirosina en la posición 694 (pSTAT5) mediante Western blot (WB). Además de las proteínas procedentes del tumor #829 se analizaron proteínas de otros dos linfomas sin translocación ni mutaciones puntuales en JAK2 y una muestra control. Únicamente el tumor #829 presentó altos niveles de STAT5 fosforilada, sugiriendo que en dicho tumor se está produciendo una activación constitutiva de la vía JAK-STAT (**Figura 12**).

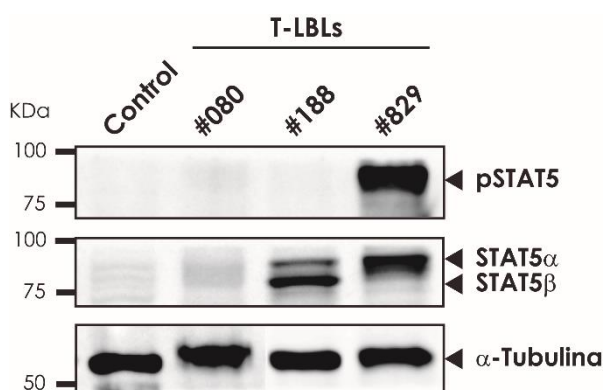


Figura 12. Análisis de la activación de la vía JAK-STAT en T-LBLs. La expresión de STAT5 fue determinada mediante WB en un total de tres tumores y un control (timo fetal) utilizando el anticuerpo que reconoce la tirosina 694 fosforilada de STAT5 (pSTAT5) y otro anticuerpo capaz de detectar STAT5 total. Como control de carga se utilizó un anticuerpo contra α -Tubulina. Únicamente el tumor #829 presentó altos niveles de pSTAT5.

2.- Seis mutaciones en el gen JAK2 en dos T-LBLs pediátricos sugieren la existencia de una heterogeneidad sub-clonal en estos tumores.

Dada la importancia de las mutaciones del gen JAK2 en síndromes mieloproliferativos (Kouroupi *et al.*, 2008; Vainchenker *et al.*, 2008; Vainchenker y Constantinescu, 2013) y los escasos antecedentes en leucemias/linfomas linfoblásticos de células T precursoras, se realizó un estudio mutacional detallado en nuestra serie de T-LBLs utilizando mayor profundidad de análisis que en otros trabajos anteriores. La búsqueda de mutaciones se centró en el dominio pseudoquinasa de la proteína, que es el que acumula la práctica totalidad de las mutaciones que se han descrito hasta la fecha. Para ello, se diseñó una pareja de cebadores que cubría desde el exón 12 hasta el 16 del gen JAK2 (**Tabla Suplementaria 2**), se sintetizó el ADNc mediante retro-transcripción, y se amplificó el fragmento específico del ARNm de JAK2 mediante PCR convencional. El producto de PCR amplificado de cada uno de los linfomas se secuenció utilizando otras parejas de cebadores que reconocían zonas intermedias de la secuencia amplificada (**Tabla Suplementaria 2**). Las secuencias resultantes se compararon con la secuencia referencia de JAK2 ENST00000381652 (Ensembl: <http://www.ensembl.org/>). Aunque una buena parte de los linfomas presentaron cromatogramas muy claros coincidentes con la secuencia de referencia, seis tumores presentaron cromatogramas muy complejos que hacían imposible su interpretación. Puesto que las muestras de ADNc eran de muy buena calidad, la razón más probable sería la existencia de heterogeneidad intratumoral. Por este motivo los productos de PCR de estos linfomas se clonaron en el vector *pGEM^R-T Easy*, y se secuenciaron un total de 20 clones positivos de cada uno de los linfomas con los cebadores indicados anteriormente. Los resultados revelaron que dos linfomas pediátricos, #460 y #734, acumulaban ocho cambios de nucleótido (SNVs) y que seis de las variantes suponían un cambio de aminoácido (mutaciones de cambio de sentido) que podría afectar a la funcionalidad de la proteína JAK2 (**Figura 13** y **Tabla 2**).

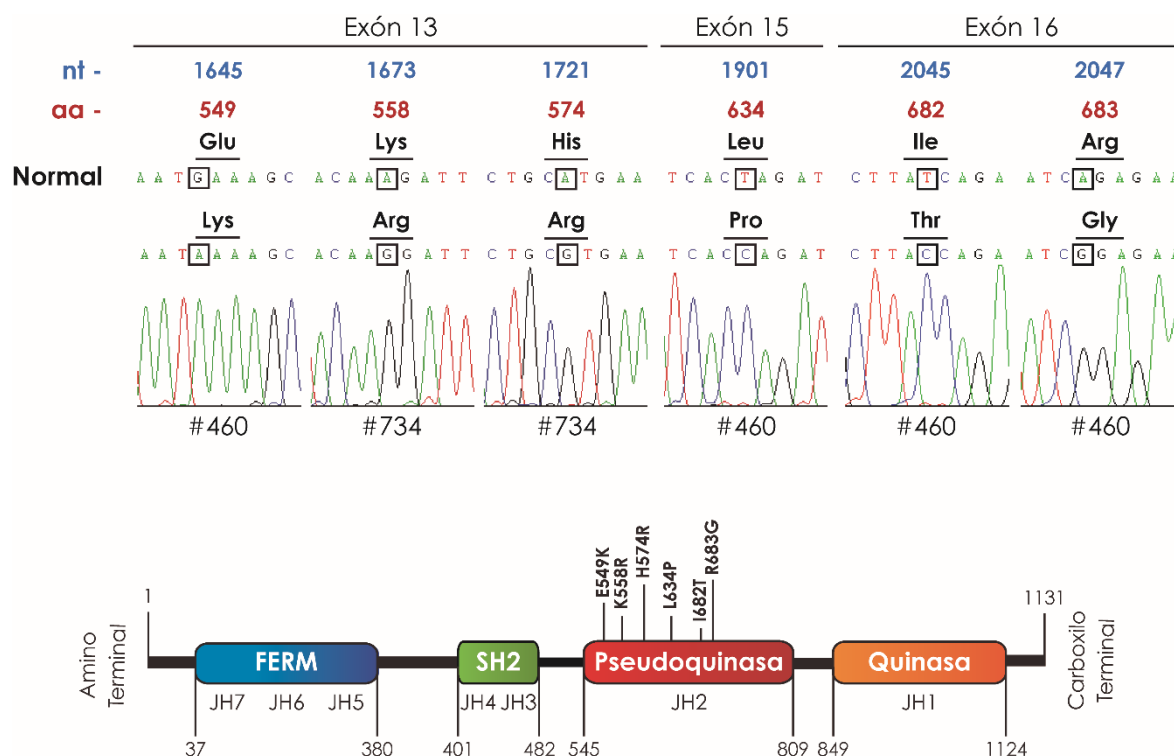


Figura 13. Seis mutaciones de cambio de sentido en dos T-LBLs pediátricos. El análisis de los cromatogramas de clones individuales reveló la presencia de seis mutaciones de cambio de sentido en el ADNc en los linfomas #460 y #734. En la parte superior se indican los exones afectados, y en la parte inferior se muestra la localización de las mutaciones en el dominio pseudoquinasa de la proteína JAK2. **nt**: nucleótido; **aa**: aminoácido; **JH**: dominios de homología Janus.

De acuerdo con la información contenida en el catálogo de mutaciones somáticas en cáncer COSMIC (cancer.sanger.ac.uk/cosmic), tres de las seis mutaciones de cambio de sentido encontradas en el ADNc de JAK2, E549K, K558R, y H574R, no habían sido descritas previamente para este gen; la mutación I682T ha sido descrita recientemente en carcinoma de intestino grueso (COSMIC: COSM1462578); la mutación L634P también había sido identificada en tumores del intestino grueso; y la mutación R683G, había sido descrita en varios trabajos como una mutación activante de JAK2 que afecta a pacientes con leucemia linfoblástica aguda infantil de células B precursoras, principalmente en casos asociados a síndrome de Down (Bercovich *et al.*, 2008; Gaikwad *et al.*, 2009; Kearney *et al.*, 2009; Mullighan, Collins-Underwood *et al.*, 2009; Dusa *et al.*, 2010; Yoda *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren la existencia de heterogeneidad sub-

clonal en nuestros linfomas #460 y #734, ya que, además de la secuencia normal de referencia, cada uno de esos linfomas presenta más de dos transcritos diferentes, sin que haya ningún indicio de variaciones en el número de copias (CNVs) que afecten al locus *JAK2* (datos no mostrados).

Tabla 2. Tipos y frecuencias de las mutaciones identificadas en el gen *JAK2* en dos T-LBLs pediátricos. En la parte superior se indican los transcritos hallados en cada uno de los dos linfomas. En la parte inferior se indican las frecuencias de cada mutación en ADNc y ADN genómico obtenidas con cada uno de los dos procedimientos utilizados (secuenciación de clones o pirosecuenciación). Entre paréntesis aparecen las frecuencias corregidas al descontar la cantidad estimada de células no-tumorales en cada muestra. **ND:** no determinado.

	Transcrito 1	Transcrito 2	Transcrito 3	Transcrito 4	Transcrito 5	Transcrito 6
#460	Normal	c.1645G>A p.E549K	c.1755A>G p.K585K	c.1901T>C p.L634P	c.2045T>C p.L682T	c.2047A>G p.R683G
Secuenciación clones		5% (7.14%)	5% (7.14%)	5% (7.14%)	5% (7.14%)	10% (14.28%)
Pirosecuenciación ADNc		ND	ND	ND	6.03% (8.61%)	1.26% (1.80%)
Pirosecuenciación ADN		ND	ND	1.81% (2.58%)	0%	0%
#734	Normal	c.1673A>G p.K558R	c.1721A>G p.H574R	c.1758A>G p.A586A		
Secuenciación clones		5% (6.25%)	5% (6.25%)	5% (6.25%)		
Pirosecuenciación ADNc		ND	17.28% (21.6%)	ND		
Pirosecuenciación ADN		ND	16.41% (20.51%)	ND		

La existencia de estas mutaciones en el transcriptoma y en el genoma de los linfomas #460 y #734 fue corroborada mediante pirosecuenciación a partir de una segunda ronda de retro-transcripción o muestras de ADN, respectivamente. Estos análisis fueron realizados por el Dr. Agustín F. Fernández en el laboratorio del Dr. Mario Fraga (CNB, Hospital Central de Asturias). En este caso los fragmentos a secuenciar fueron de menor tamaño y se centraron exclusivamente en regiones muy pequeñas que contenían las mutaciones previamente descritas, utilizando varias combinaciones de cebadores específicos (Tabla Suplementaria 2). Los resultados de la pirosecuenciación confirmaron la realidad de las mutaciones que se habían detectado con la secuenciación de los clones de ADNc, aunque las frecuencias de cada una de ellas eran relativamente bajas oscilando entre un 1.26% y un 17.28%. Estas cifras aumentarían ligeramente (1.80%-21.6%) si se descuenta el porcentaje de células no-tumorales presente en las muestras (Tabla

Suplementaria 1). Por problemas con el diseño de los cebadores los análisis de las mutaciones E549K y K558R no se pudieron realizar correctamente. Sin embargo, hay que destacar que las mutaciones I682T y R683G no se encontraron en el ADN genómico, sugiriendo un posible proceso de editado del ARN (**Tabla 2**).

3.- Análisis funcional “in silico” de las mutaciones.

Como paso previo a los ensayos funcionales se utilizaron dos herramientas *on line* para predecir el posible efecto perjudicial de las mutaciones de cambio de sentido. La primera herramienta, Polyphen-2 (genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), es un algoritmo capaz de predecir los posibles efectos estructurales y funcionales que causaría el cambio de un aminoácido. Esta predicción se basa en la propia secuencia y la información estructural de la proteína, asignando unos valores de estimación comprendidos entre 0.00 y 1.00, de modo que los valores más próximos a 0.00 no tendrían un efecto perjudicial y los valores próximos a 1.00 serían los que mayor daño causarían a la función proteica. De acuerdo con este algoritmo las mutaciones E549K, K558R, L634P y R683G deberían ser perjudiciales o deletéreas con unos valores comprendidos entre 0.98 y 1.00. Sin embargo, las mutaciones H574R e I682T con unos valores de 0.18 y 0.09, respectivamente, no tendrían efecto perjudicial sobre JAK2 (**Tabla 3**).

La segunda herramienta utilizada fue SIFT (sift.bii.a-star.edu.sg), cuyo algoritmo se basa principalmente en la homología de secuencias a lo largo de la escala evolutiva. En este caso también se asignan unos valores entre 0.00 y 1.00, pero al contrario que la anterior, 1.00 sería un cambio tolerado y 0.00 una mutación no tolerada y perjudicial para la proteína. Según esta herramienta predictiva, las mutaciones L634P y R683G serían las dos únicas perjudiciales para JAK2 con unos valores de 0.01 y 0.00, respectivamente. El resto serían tolerables con unos valores que irían desde 0.06 a 0.77 (**Tabla 3**).

Tabla 3. Predicción del posible efecto funcional de las mutaciones de cambio de sentido encontradas en el gen *JAK2*. En la tabla se indican las predicciones realizadas con las herramientas predictivas Polyphen-2 y SIFT.

Predicción	Polyphen-2		SIFT	
	Benigna	Probablemente dañina	Tolerada	Afecta a la función proteica
E549K		0.99	0.06	
K558R		0.98	0.42	
H574R	0.18		0.77	
L634P		1.00		0.01
I682T	0.09		0.16	
R683G		1.00		0.00

Dado que ambas estimaciones presentaron importantes discrepancias, y que la mutación R683G había sido ya descrita por varios trabajos anteriores como una mutación activante de JAK2 (Kearney *et al.*, 2009; Mullighan, Collins-Underwood *et al.*, 2009; Dusa *et al.*, 2010), se procedió a realizar los ensayos *in vitro* con las seis mutaciones, tomando a R683G como control positivo.

4.- Ensayos luciferasa en células deficientes para JAK2 demuestran que sólo las mutaciones H574R y R683G son capaces de sobre-activar la vía JAK-STAT.

Para comprobar si los mutantes de JAK2 eran capaces de activar constitutivamente la vía JAK-STAT, se realizaron ensayos luciferasa en las células γ 2A que son incapaces de expresar la proteína JAK2. Para el ensayo las células se co-transfectaron con un vector de expresión portador de cinco copias de elementos de respuesta a STAT5, un vector capaz de expresar STAT5A y un vector que expresa el ADNc de JAK2 normal o el de cada uno de los mutantes. De este modo, si alguno de los mutantes era capaz de sobre-activar la vía, sería esperable detectar valores de luminiscencia mayores que los inducidos por la proteína normal. Los resultados demostraron que todos los mutantes tenían una tendencia a aumentar la señal luciferasa con respecto a la proteína normal, pero sólo dos de ellos, H574R y R683G, fueron capaces de incrementar los valores de forma significativa (**Figura 14**).

Nuestros resultados corroboran, por tanto, la capacidad activadora de la mutación R683G como se había demostrado en trabajos anteriores (Kearney *et al.*, 2009; Mullighan, Collins-Underwood *et al.*, 2009; Dusa *et al.*, 2010).

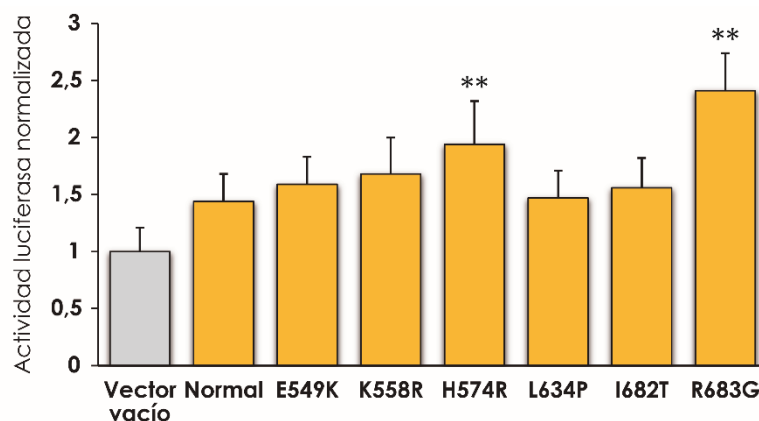


Figura 14. Efecto de las mutaciones de JAK2 en la activación de la vía JAK-STAT en las células γ 2A mediante ensayo luciferasa. Gráfica que muestra la actividad transcripcional de STAT5 en las células γ 2A transfectadas con JAK2 normal o mutado, o con el vector vacío como control. Los datos corresponden a valores normalizados de la actividad luciferasa calculados por la relación luciferasa/Renilla. La gráfica muestra los valores medios de tres ensayos independientes, cada uno de ellos por triplicado. Las barras de error representan la desviación típica, y la significación estadística con respecto a JAK2 normal se indica con asteriscos: ** $p < 0.01$.

Para comprobar si las diferencias observadas en la señal luciferasa no se debían a diferencias en la expresión de JAK2 en las distintas construcciones, se determinaron los niveles de expresión de la proteína mediante WB en todas las situaciones experimentales descritas. Los resultados obtenidos evidenciaron que todas las construcciones expresaban niveles muy semejantes de JAK2 (Figura 15). Por tanto, las diferencias encontradas en el ensayo luciferasa se podrían atribuir a la naturaleza de las propias mutaciones y no a diferencias cuantitativas en los niveles de expresión de JAK2.

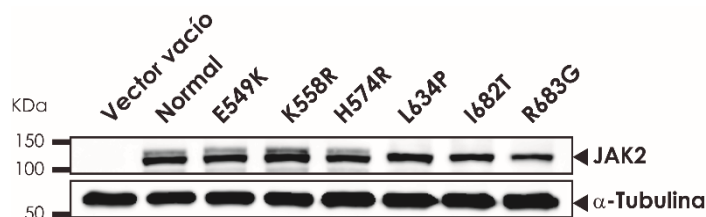


Figura 15. Niveles de expresión de las construcciones con JAK2 normal o mutante en las células γ 2A. Las proteínas extraídas en paralelo a los ensayos luciferasa fueron cuantificadas por WB utilizando el anticuerpo que reconoce la proteína JAK2 total. Como control de carga se utilizó α -Tubulina.

5.- Los ensayos realizados con una línea celular dependiente de citoquina demuestran que la mutación R683G es capaz de inducir proliferación celular con independencia de citoquina.

Dado que en los ensayos luciferasa únicamente las mutaciones H574R y R683G fueron capaces de potenciar significativamente la activación de la vía, el paso siguiente fue comprobar si las proteínas mutantes eran capaces de inducir un mayor grado de proliferación celular que la proteína JAK2 normal. Estos ensayos se realizaron con la línea celular BaF3-EpoR, una línea celular proB de ratón que expresa de manera estable el receptor de eritropoyetina (EpoR) y necesita la adición de eritropoyetina (Epo) al medio de cultivo para poder proliferar. Las células BaF3-EpoR fueron transducidas con vectores de expresión portadores de la secuencia normal de JAK2, las secuencias mutantes (H574R y R683G), o el vector vacío como control, hasta generar líneas transfectadas estables. Las células transducidas con las correspondientes construcciones fueron seleccionadas (*sorting*) para obtener líneas estables que expresaban niveles similares, o equivalentes, de expresión de JAK2. Finalmente, las líneas crecieron durante cuatro días en medio sin Epo para realizar las curvas de proliferación. Los resultados demostraron que la mutación H574R y la proteína normal presentaban diferencias menores en sus perfiles de proliferación en ausencia de Epo, que decaían significativamente a partir del segundo día, pero la mutación R683G aumentaba significativamente los niveles de proliferación con un incremento constante hasta el cuarto día, evidenciando una clara independencia de citoquina (**Figura 16A**). Nuestros resultados corroboran los obtenidos por otros autores en el caso de la mutación R683G (Kearney *et al.*, 2009; Mullighan *et al.*, 2009; Dusa *et al.*, 2010). Sin

embargo, cuando se consideraron únicamente los porcentajes de células viables durante el desarrollo experimental, el porcentaje de células viables con el mutante H574R era mayor que el de células viables que expresaban la proteína normal a lo largo de todo el proceso. Como era de esperar, el mutante R683G mantenía los porcentajes de viabilidad más elevados durante todo el ensayo (**Figura 16B**).

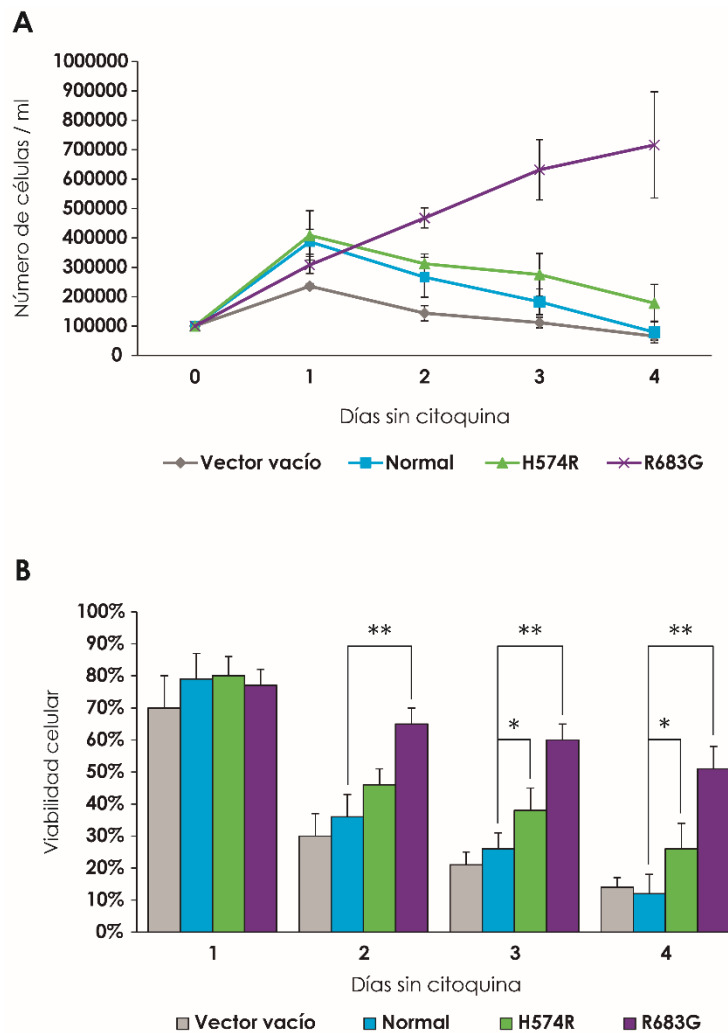


Figura 16. Efecto de las mutaciones en la proliferación y viabilidad de las células BaF3-EpoR en ausencia de citoquina. Las líneas BaF3-EpoR estables con las construcciones JAK2 normal, el mutante H574R, el mutante R683G, y el vector vacío como control, se pusieron a crecer con una densidad de 1×10^5 células/ml durante cuatro días consecutivos, realizándose recuentos de las células viables y el número o porcentaje de células totales cada día. **(A)** Gráfica que muestra los valores de proliferación de cada una de las líneas celulares. **(B)** Representación mediante histograma de barras de los porcentajes de viabilidad de cada una de las líneas celulares, con indicación de los niveles de significación de las diferencias encontradas entre cada uno de los mutantes con respecto al JAK2 normal. Los resultados obtenidos derivan de la realización de tres experimentos independientes, y por triplicado. Las barras de error representan la desviación típica; y la significación estadística se indica con un asterisco: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

La extracción de proteínas nos permitió determinar los niveles de fosforilación de las proteínas JAK2 y STAT5 mediante WB. Los resultados corroboran lo esperado: sólo el mutante R683G era capaz de inducir niveles progresivamente más altos de JAK2 y STAT5 fosforilados a pesar de estar creciendo en ausencia de Epo (**Figura 17**).

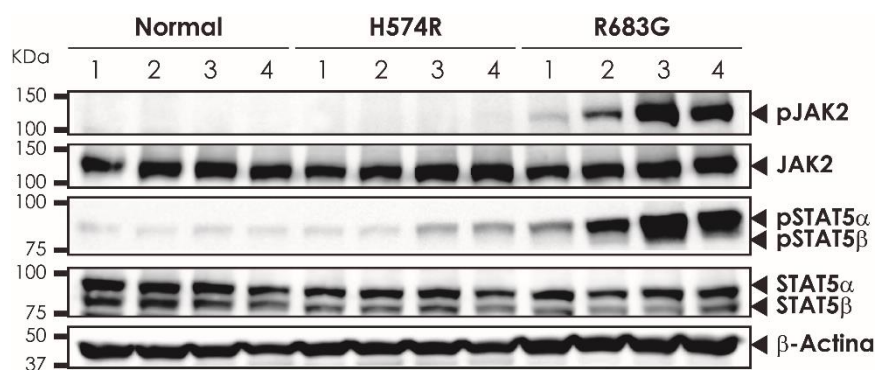


Figura 17. Análisis de la activación de JAK2 y STAT5 en las células BaF3-EpoR estables creciendo en ausencia de citoquina. Se sembraron cuatro puntos de 1×10^7 millones de cada una de las líneas BaF3-EpoR que expresan de manera estable la proteína normal, o los mutantes H574R y R683G. Se fueron recogiendo muestras a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo en ausencia de Epo. Las proteínas obtenidas se analizaron mediante WB utilizando los anticuerpos contra las proteínas JAK2 y STAT5 fosforiladas y no fosforiladas. Como control de carga se utilizó un anticuerpo contra β -Actina. En el WB se puede observar que sólo el mutante R683G fue capaz de mantener la fosforilación de JAK2 y STAT5 al menos durante cuatro días.

Aunque el mutante H574R no fue capaz de mantener los niveles de proliferación en ausencia de citoquina, quisimos comprobar si en condiciones de estímulo respondía igual que la proteína normal. Para ello, las células BaF3-EpoR transducidas se mantuvieron durante 24 horas en ausencia de Epo, y entonces se sometieron a un estímulo con 1 U/ml de Epo durante 20 minutos. Tras el estímulo se extrajeron las proteínas y se analizaron los niveles de JAK2 y STAT5 fosforiladas mediante WB. Los resultados indicaron que tras el estímulo con Epo las células con los mutantes H574R y R683G, presentaban mayor cantidad de pJAK2 que las células transducidas con JAK2 normal (**Figura 18**). Por tanto, aunque el mutante H574R no era capaz de mantener la fosforilación de JAK2 en ausencia de estímulo, sí que era capaz de fosforilarse hasta alcanzar unos niveles similares a los del mutante R683G.

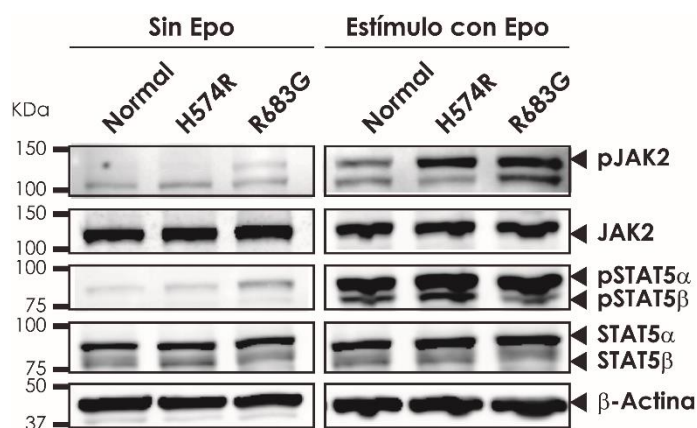


Figura 18. Análisis de la activación de JAK2 y STAT5 en las células BaF3-EpoR estables en respuesta a un estímulo. Se sembraron (por duplicado) 1×10^7 millones de células de cada una de las líneas BaF3-EpoR que expresan establemente la proteína normal, o los mutantes H574R y R683G, y se dejaron durante 24 horas en medio sin Epo. Después se realizó un estímulo a uno de los cultivos con 1 U/ml de Epo durante 20 minutos, manteniéndose el otro como control no tratado. Posteriormente las proteínas obtenidas fueron analizadas por WB. En el panel de la izquierda se muestran las tres líneas recogidas a las 24 horas sin Epo y en el panel de la derecha las células que fueron estimuladas con Epo. En ambos casos se incubaron con los anticuerpos contra JAK2 y STAT5 fosforilados y no fosforilados, y contra β -Actina como control de carga. Ambos mutantes, H574R y R683G, presentaron niveles de proteína JAK2 fosforilada más elevados que el control.

6.- Alteraciones epigenéticas en los reguladores negativos de la vía JAK-STAT.

Otro evento frecuente que puede contribuir a la desregulación de la vía JAK-STAT es el silenciamiento de alguno de sus reguladores negativos. En el caso del gen *SHP1*, se ha observado que su expresión se encuentra alterada en diferentes tipos de tumores (Wu *et al.*, 2003), incluyendo su silenciamiento en leucemias y linfomas, además de en líneas celulares de linfomas de células T (Zhang *et al.*, 2000; Oka *et al.*, 2002) debido a la hipermetilación de su promotor. Por otro lado, los genes de la familia *SOCS*, son otros miembros de la vía JAK-STAT que actúan como reguladores negativos que se han encontrado también alterados en varias patologías cancerígenas. Estas alteraciones afectan principalmente a sus niveles de expresión, aunque hay algunas mutaciones descritas (Kazi *et al.*, 2014). Los genes *SOCS1* y *SOCS3*, al igual que *SHP1*, también se encuentran silenciados por hipermetilación en diferentes tipos de cánceres. En el caso de *SOCS1* su promotor está hipermetilado en carcinoma hepatocelular, melanoma, leucemia mieloide aguda (AML), etc. El promotor de *SOCS3* llega a estar hipermetilado hasta en un

90% de los tumores de cabeza y cuello (Weber *et al.*, 2005), y en menor frecuencia en cáncer de pulmón, de próstata, etc. Por tanto, *SOCS1* y *SOCS3* también actúan como genes supresores de tumores en la vía JAK-STAT (Alexander, 2002; Fourouclas *et al.*, 2008; Inagaki-Ohara *et al.*, 2013). Con todos estos antecedentes y debido a la falta de datos en T-LBLs, nos pareció interesante comprobar si los promotores de alguno de estos genes se encontraba hipermetilado en los T-LBLs.

6.1.- La hipermetilación de *SOCS3* podría contribuir a la activación de la vía JAK-STAT en los linfomas con *JAK2* mutado.

Para determinar los niveles de metilación de los promotores de los genes *SHP1*, *SOCS1* y *SOCS3* se realizó inicialmente una PCR específica de metilación (MSP) en los dos linfomas que presentaban mutaciones en *JAK2* y en el linfoma con la translocación TEL-*JAK2*. Para ello se diseñaron unos cebadores específicos ([Tabla Suplementaria 2](#)) que permitieran amplificar la isla CpG que engloba el inicio de la transcripción en el promotor de cada uno de esos genes ([Figura 19](#)). Los resultados de la MSP revelaron que no había cambios en el estatus de metilación en los promotores de los genes *SHP1* y *SOCS1* en ninguno de los tres linfomas analizados. Sin embargo, el promotor del gen *SOCS3* se encontraba significativamente hipermetilado en comparación con las dos muestras control procedentes de timos fetales ([Figura 20](#)).

La densidad o grado de metilación de la región analizada en el promotor de *SOCS3*, se determinó mediante secuenciación del promotor utilizando otros cebadores específicos ([Tabla suplementaria 2](#)) que permitían la amplificación de un fragmento mayor que contenía la región MSP. Se secuenciaron diez clones de cada una de las muestras, y los resultados confirmaron que el promotor de *SOCS3* se encuentra hipermetilado en los tres linfomas con densidades variables, pero siempre por encima del umbral establecido (15%) (Kuang *et al.*, 2010). Los valores para cada linfoma fueron, #460: 45.2%, #734: 77.2% y #829: 94.8% ([Figura 21](#)).

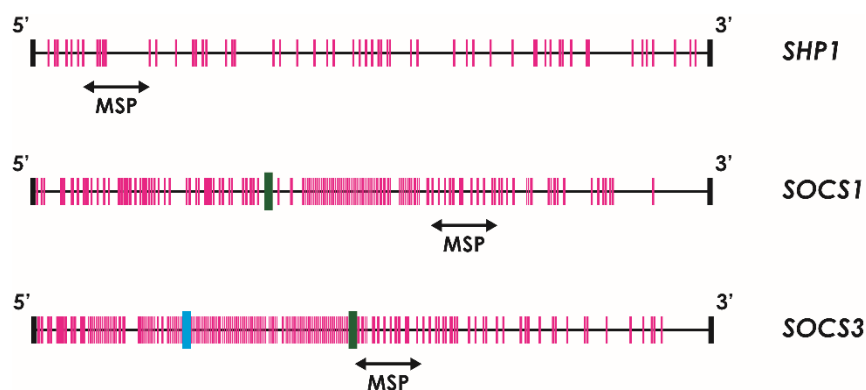


Figura 19. Islas CpG con indicación de las secuencias amplificadas para los análisis mediante PCR específica de metilación (MSP) en los promotores de los genes *SHP1*, *SOCS1* y *SOCS3*. En el esquema se representan las islas CpG que engloban los sitios de inicio de la transcripción de cada uno de los genes y las secuencias amplificadas para el análisis epigenético. Cada nucleótido CpG está representado por una línea vertical rosa, las líneas verticales en azul representan el inicio de la transcripción, y las líneas verticales en verde indican los sitios de inicio de la traducción.

Muestras control		T-LBLs					Controles PCR			
#407	#408	#460	#829	#734	NL	IVD	H ₂ O			
U	M	U	M	U	U	U	U			
										<i>SHP1</i>
										<i>SOCS1</i>
										<i>SOCS3</i>

Figura 20. MSP en la región específica de los promotores de *SHP1*, *SOCS1* y *SOCS3*. Resultados de la MSP donde se puede observar que sólo el gen *SOCS3* se encuentra metilado en los tumores #460, #734 y #829. Como controles se utilizaron dos timos fetales, #407 y #408. Las letras U y M en la parte superior indican, no metilado (*Unmethylated*) y metilado (*Methylated*), respectivamente. Se utilizó el ADN de linfocitos normales (*Normal Lymphocytes*) como control no metilado y un ADN metilado *in vitro* (*In Vitro DNA*) como control positivo de la MSP.

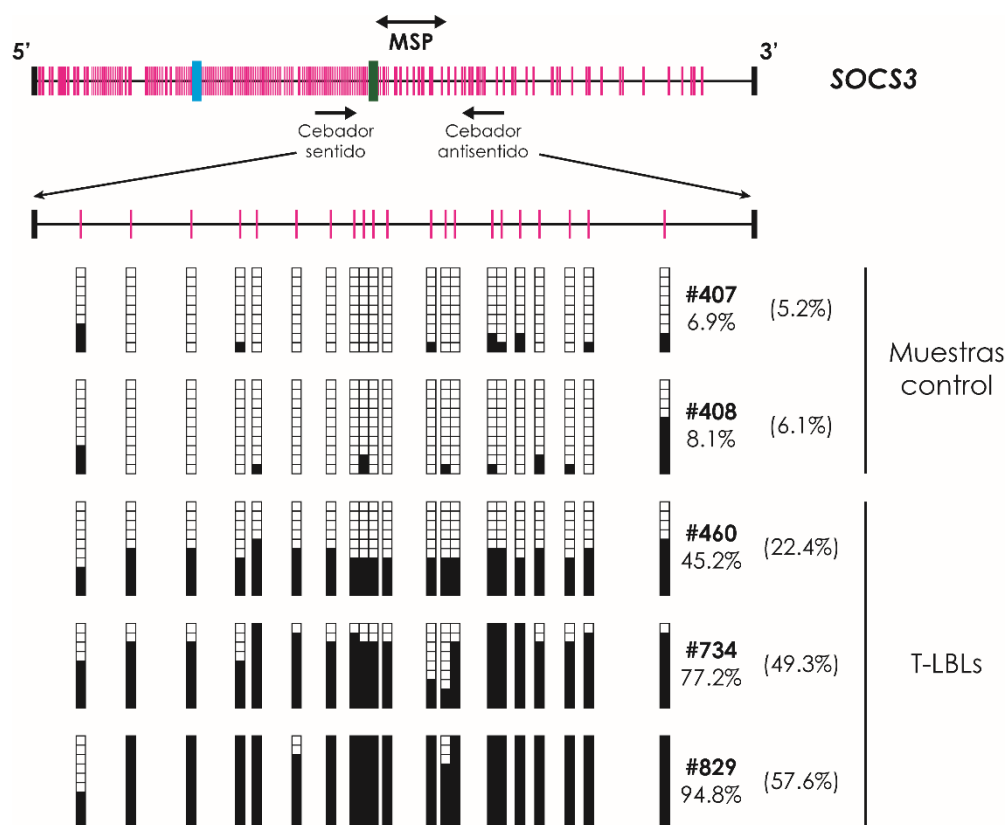


Figura 21. Perfil de metilación de SOCS3 en los tres T-LBLs que presentan mutaciones en JAK2.

En la parte superior se muestran las islas CpG que engloban el inicio de transcripción del gen SOCS3, y en la parte inferior se muestra la región amplificada por MSP y la posteriormente secuenciada, marcando cada dinucleótido CpG con una línea vertical de color rosa. Cada cuadrado representa un sitio CpG en cada uno de los clones secuenciados, apareciendo en blanco cuando no está metilado, o en negro cuando si lo está. Entre paréntesis se muestran los valores obtenidos mediante pirosecuenciación.

6.2.- La hipermetilación de SOCS3 no es una propiedad exclusiva de los linfomas con JAK2 mutado.

Para ver si los resultados obtenidos correspondían exclusivamente a las muestras mutadas o eran una característica generalizada de todos los T-LBLs, analizamos también los otros linfomas que no tenían el gen JAK2 mutado. Para ello se realizó de nuevo un análisis mediante MSP de SHP1, SOCS1 y SOCS3, los resultados revelaron que el gen SOCS1 no estaba metilado en ninguna de las muestras; que el gen SHP1 estaba claramente metilado en un T-LBL (#685); y que el gen SOCS3 estaba hipermetilado en los nuevos linfomas analizados (Figura 22).

Muestras control		T-LBLs										Controles PCR			
#407	#408	#038	#516	#226	#080	#685	#188	#192	#135	#346	#238	NL	IVD	H ₂ O	
U	M	U	M	U	M	U	M	U	M	U	M	U	M	U	M
															SHP1
															SOCS1
															SOCS3

Figura 22. MSP en la región específica de los promotores de *SHP1*, *SOCS1* y *SOCS3* en 10 T-LBLs sin mutaciones en *JAK2*. Resultados de la MSP donde se puede observar que sólo el tumor #685 tiene el gen *SHP1* metilado, y que ocho de los tumores tienen el promotor del gen *SOCS3* metilado, mientras que ninguno de los tumores tiene metilado el promotor de *SOCS1*. Como controles se utilizaron dos timos fetales, #407 y #408. Las letras de la parte superior indican, **U** (no metilado) y **M** (metilado). El ADN de linfocitos normales (**NL**) se utilizó como control no metilado y un ADN metilado in vitro (**IVD**) como control positivo de la MSP.

Al igual que en los tres linfomas con mutaciones en el gen *JAK2*, se evaluó la densidad de metilación del promotor de *SOCS3* utilizando los mismos cebadores que mencionamos anteriormente ([Tabla Suplementaria 2](#)). Se secuenciaron diez clones en cada uno de los tumores, y los resultados revelaron que siete de los T-LBLs analizados presentaban unas densidades de metilación significativas por encima del umbral del 15%. Los niveles de metilación fueron validados mediante pirosecuenciación (datos entre paréntesis) ([Figura 23](#)). Por tanto, se podría pensar que la hipermetilación de *SOCS3* podría ser un evento temprano en el desarrollo de T-LBLs y que no está ligado necesariamente a la aparición de mutaciones en el gen *JAK2*.

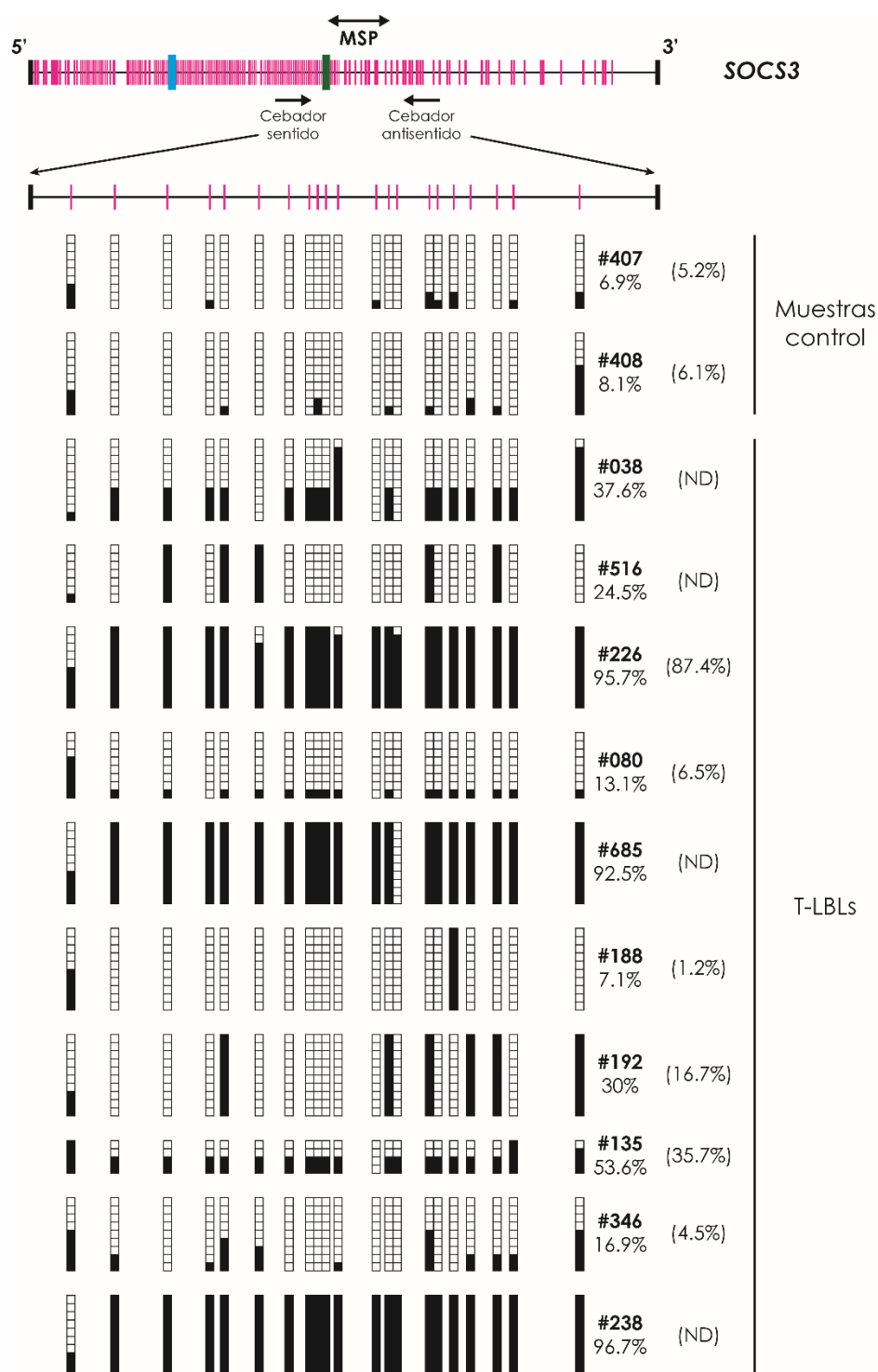


Figura 23. Perfiles de metilación de SOCS3 en los T-LBLs que no presentan mutaciones en JAK2.

En la parte superior se muestran las islas CpG que engloban el inicio de la transcripción del gen **SOCS3**, y en la parte inferior se muestra la región amplificada por MSP y posteriormente secuenciada, marcando en detalle cada dinucleótido CpG (líneas verticales rosas). Cada cuadrado representa un sitio CpG en cada uno de los clones secuenciados, apareciendo en blanco cuando la citosina no está metilada, o en negro cuando si lo está. Entre paréntesis se muestran los datos obtenidos mediante pirosecuenciación.

6.3.- Los tratamientos de las células Jurkat y Molt-4 con drogas demetilantes e inhibidores de deacetilasas aumentan significativamente la expresión de SOCS3.

Para comprobar si la hipermetilación del promotor de SOCS3 estaba involucrada en la desregulación de su expresión, se seleccionaron dos líneas celulares derivadas de leucemias/linfomas linfoblásticos T con altas densidades de metilación, y se sometieron al tratamiento con una droga demetilante y un inhibidor de deacetilasas. Los análisis de MSP y la secuenciación de sus ADNs tratados con bisulfito (utilizando los cebadores indicados en la [Tabla Suplementaria 2](#)) evidenciaron que las células Jurkat y Molt-4 tenían significativamente hipermetilado el promotor del gen SOCS3, con unas densidades de metilación muy altas (93.7% y 92.3%, respectivamente) y semejantes a las de algunos de nuestros linfomas primarios, como el #829 ([Figura 24](#)).

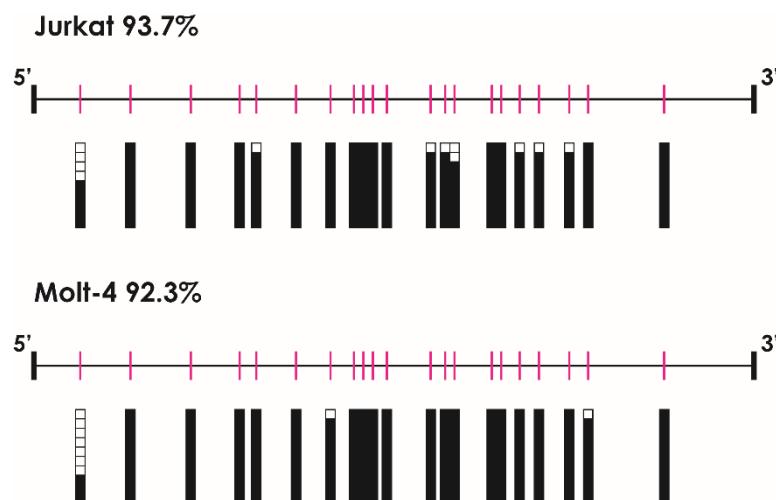


Figura 24. Perfiles de metilación de SOCS3 en células Jurkat y Molt-4. Representación de los resultados de la secuenciación de diez clones de las células Jurkat (parte superior) y diez clones de Molt-4 (parte inferior). Cada cuadrado representa un sitio CpG en cada uno de los clones secuenciados, apareciendo en blanco cuando la citosina no está metilada, o en negro cuando si lo está.

A continuación, para comprobar si la demetilación del promotor de *SOCS3* estaba involucrada en la desregulación de su expresión se trataron las líneas celulares con 5-aza-2'-deoxicitidina (AZA). También se utilizó un inhibidor de deacetilasas, la tricostatina A (TSA), y la combinación de ambas drogas. Los tratamientos revelaron que estas drogas eran capaces de producir la demetilación del promotor de *SOCS3* (tras análisis con MSP), y de elevar los niveles de expresión transcripcional de *SOCS3* estimados mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) (Figura 25). Los datos demostraron que en las células Jurkat los tres tratamientos aumentaban los niveles de ARNm de *SOCS3*, siendo las diferencias significativas cuando se utilizaba AZA o la combinación de AZA y TSA (Figura 25A). En el caso de las células Molt-4 todos los tratamientos incrementaron significativamente la expresión transcripcional de *SOCS3*, sin embargo, las subidas más elevadas se produjeron al tratarlas con TSA y AZA más TSA (Figura 25B).

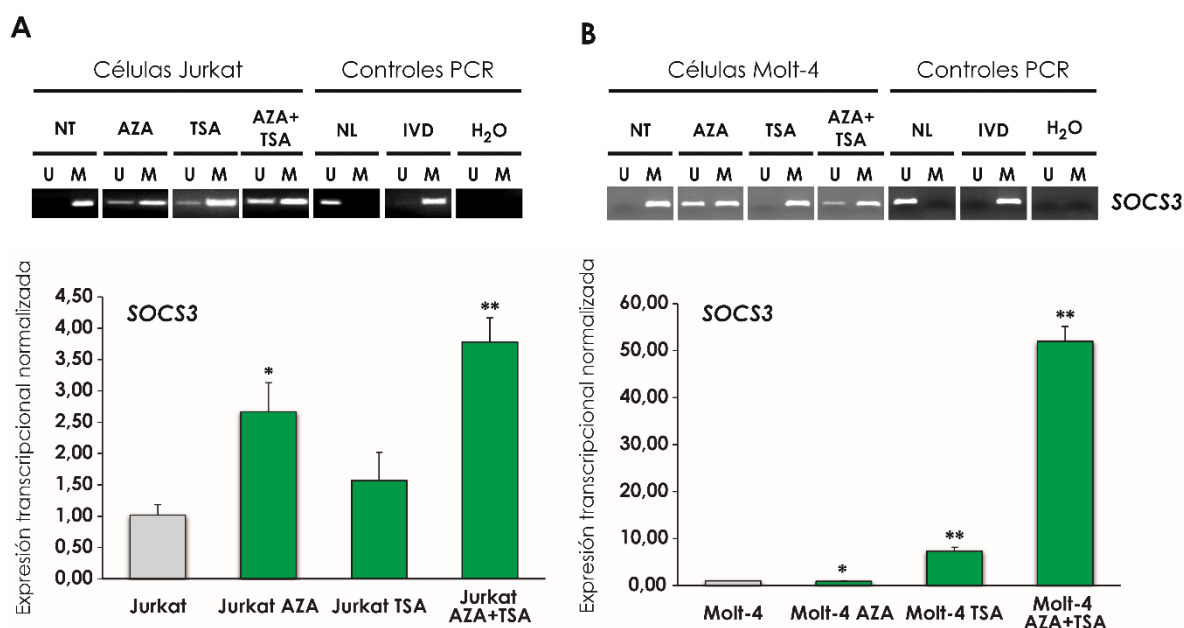


Figura 25. Tratamientos de las células Jurkat y Molt-4 con 5-aza-2'-deoxicitidina (AZA) y tricostatina A (TSA). Las células Jurkat (**A**) y Molt-4 (**B**) fueron tratadas con AZA, TSA o con una combinación de ambos para analizar los cambios de metilación del promotor del gen *SOCS3* por MSP (parte superior). La letra **U** se refiere a no metilado y la letra **M** a metilado. La parte inferior muestra las gráficas que indican los niveles de ARNm de *SOCS3* por RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Los datos de expresión se normalizaron con el gen que codifica para la proteína Beta-2 microglobulina (B2-M) y en ambas líneas se compararon con la situación control sin tratar. Las gráficas muestran la media de tres experimentos independientes, cada uno de ellos por triplicado. Las barras de error representan la desviación típica; y la significación estadística se indica con un asterisco: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

7.- Las mutaciones activantes de JAK2 no son capaces de incrementar los niveles de pSOCS3 endógenos de las células BaF3-EpoR y γ 2A.

La regulación negativa que ejerce el gen SOCS3 sobre la vía JAK-STAT se ve reducida principalmente por mecanismos epigenéticos relacionados con la hipermetilación de su promotor. Sin embargo, SOCS3 puede ser fosforilado en dos de sus residuos tirosina (204 y 221) por las proteínas JAKs, y esta fosforilación reduciría la vida media de SOCS3 al activar su degradación por el proteasoma (Haan *et al.*, 2003). De hecho, en muestras de pacientes con síndromes mieloproliferativos se ha relacionado el aumento en los niveles de pSOCS3 con la presencia de mutaciones activantes en JAK2 o con la translocación PCM1-JAK2 (Hookham *et al.*, 2007; Elliott *et al.*, 2009). Para comprobar si las mutaciones H574R y R683G son capaces de aumentar los niveles de pSOCS3, determinamos los niveles de pSOCS3 endógeno en dos experimentos diferentes utilizando células BaF3-EpoR (que expresan de manera estable ambas mutaciones y JAK2 normal) y células γ 2A (deficientes para JAK2, transfectadas transitoriamente con JAK2 normal o mutante) mediante inmunoprecipitación siguiendo los protocolos descritos por Elliot *et al.*, 2009. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en los niveles de SOCS3 fosforilado que pudieran atribuirse a la presencia de las mutaciones activantes (Figura 26).

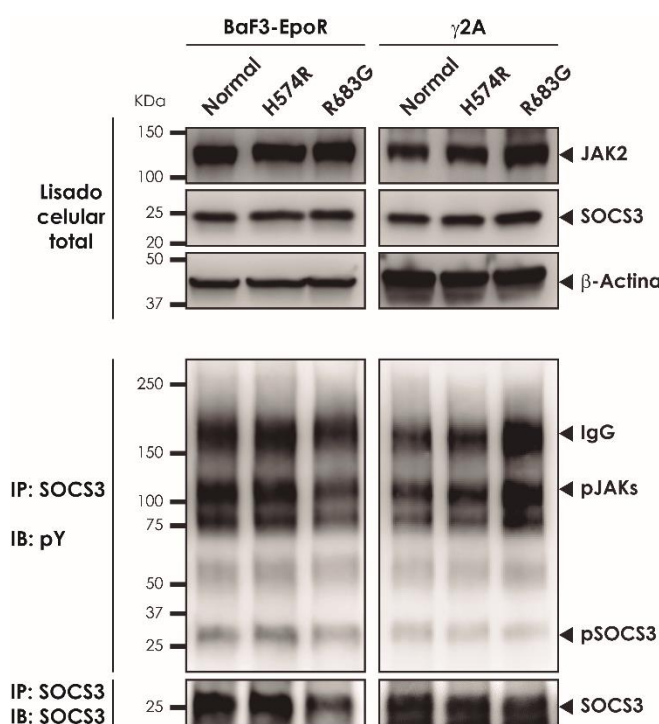


Figura 26. Análisis de pSOCS3 en las células BaF3-EpoR y γ 2A transfectadas con JAK2 normal y los mutantes H574R y R683G. Los niveles de fosforilación de SOCS3 endógeno fueron analizados en las líneas celulares BaF3-EpoR que expresan establemente las construcciones de JAK2 normal o los mutantes (izquierda), y en las células γ 2A transfectadas transitoriamente (derecha). El lisado completo se incubó con los anticuerpos contra JAK2 y SOCS3, y como control de carga se utilizó el anticuerpo contra β -Actina. Otra fracción del lisado se utilizó para la inmunoprecipitación de SOCS3 y la posterior incubación con un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas (pY). En ambas líneas celulares no se encontraron diferencias significativas en los niveles de pSOCS3 entre la proteína normal y los mutantes.

8.- Activación del gen *LMO2* por *JAK2* a través de una vía no-canónica.

Como ya se mencionó previamente, el grupo del Dr. Kouzarides demostró que *JAK2* era capaz de entrar en el núcleo de varios tipos de células hematopoyéticas e inducir la expresión del gen *LMO2* a través de la fosforilación de la histona 3 en su tirosina 41 (H3Y41) (Dawson *et al.*, 2009). Ya que el gen *LMO2* es un oncogén clave en la aparición y desarrollo de algunos casos de leucemias/linfomas linfoblásticos de células T (Ferrando *et al.*, 2002; Ferrando *et al.*, 2004; McCormack *et al.*, 2010; Treanor *et al.*, 2011; Matthews *et al.*, 2013) quisimos comprobar si nuestros mutantes eran también capaces de inducir la expresión de *LMO2* y si lo hacían en mayor medida que el gen *JAK2* normal.

8.1.- Todas las mutaciones de *JAK2* son capaces de aumentar significativamente los niveles de expresión transcripcional de *LMO2*.

Para evaluar el efecto de las mutaciones de *JAK2* sobre los niveles de expresión de *LMO2* se analizaron células γ 2A transfectadas con cantidades equivalentes de las construcciones con *JAK2* normal o con las secuencias mutantes. Los niveles de ARNm del gen *LMO2* fueron estimados por qRT-PCR 24 horas después de cada transfección. Los resultados revelaron que todas las proteínas mutantes eran capaces de inducir aumentos significativos en los niveles de expresión del gen *LMO2* en comparación con la proteína normal (**Figura 27**). Para descartar si las diferencias observadas se podían explicar por diferencias en los niveles de expresión de *JAK2* en las diferentes transfecciones, se realizó un análisis por WB. Los resultados revelaron que todas las construcciones expresaban *JAK2* en niveles muy semejantes (**Figura 28**).

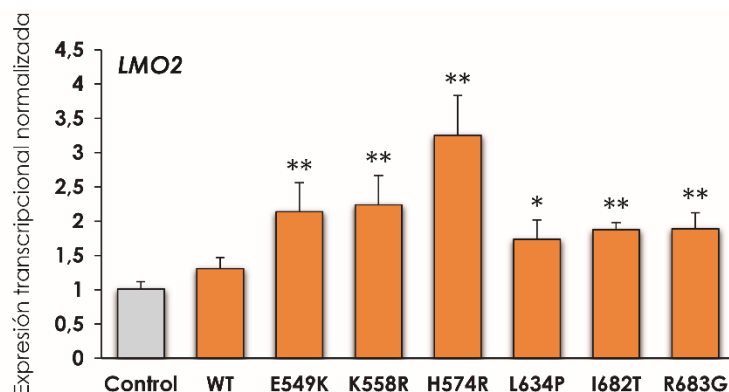


Figura 27. Expresión transcripcional mediante qRT-PCR del gen *LMO2* en células γ 2A transfectadas transitoriamente. Gráfica que muestra los niveles de ARNm de *LMO2* en las células γ 2A transfectadas con el ADNc normal o mutado de JAK2. Los datos se obtuvieron por qRT-PCR y los niveles de expresión de *LMO2* se normalizaron con respecto al gen *B2-M*. Cada valor representa la media de tres ensayos independientes, cada uno de ellos por triplicado. Las barras de error muestran la desviación típica, y la significación estadística se indica con asteriscos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

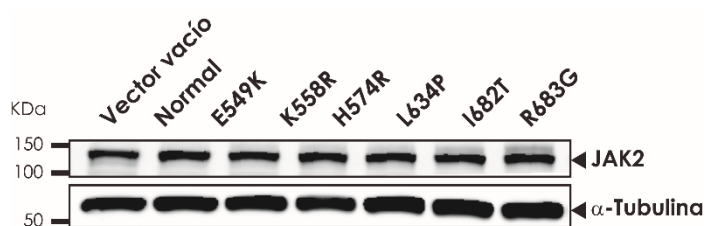


Figura 28. Niveles de expresión de JAK2 en células γ 2A transfectadas con las diferentes construcciones. Resultados del WB utilizando el anticuerpo contra JAK2 total. Como control de carga se utilizó el anticuerpo contra α -Tubulina.

8.2.- Relación entre la presencia de JAK2 en el núcleo y su capacidad para inducir la expresión de *LMO2*.

Puesto que según algunos trabajos anteriores el aumento de expresión de *LMO2* inducido por JAK2 tendría que suponer la entrada de JAK2 en el núcleo (Dawson *et al.*, 2009), decidimos comprobar si esta hipótesis era cierta. Para ello realizamos de nuevo las transfecciones de las células γ 2A manteniendo las mismas condiciones, pero en este caso se utilizaron para analizar la distribución sub-celular de JAK2 mediante inmunofluorescencia. La tinción nuclear con TO-PRO-3 permitió determinar si la localización de JAK2 en las células era exclusivamente citosólica o también nuclear. El análisis de las imágenes tomadas mediante microscopia

confocal reveló que todos los mutantes tenían un porcentaje mayor de células con JAK2 nuclear, y que las diferencias eran significativas en el caso de los mutantes H574R, L634P, I682T y R683G ([Figura 29](#) y [Figura 30](#)). Estos datos sugieren que el aumento de los niveles de expresión transcripcional de *LMO2* en las células γ 2A transfectadas con los mutantes podría estar relacionado con una mayor presencia en el núcleo de las proteínas JAK2 mutadas. Sin embargo, en el caso de los mutantes E549K y K558R, a pesar de incrementar significativamente la expresión de *LMO2*, su localización nuclear no era significativamente mayor a la de JAK2 normal, lo que sugiere la existencia de otros factores implicados.

8.3.- La co-transfección de STAT5A y JAK2 reduce considerablemente la capacidad de los mutantes para inducir la expresión del gen *LMO2*.

Puesto que las células γ 2A además de no expresar la proteína JAK2 también son deficientes en STAT5, nos preguntamos si la transfección conjunta de ambos genes, y por consiguiente la presencia de ambas proteínas, tendría algún efecto en la inducción de la expresión transcripcional de *LMO2*. Este planteamiento podría ser especialmente relevante ya que la proteína STAT5, como factor de transcripción *bona fide*, a diferencia de JAK2, sí que tiene señal de localización nuclear. Para comprobar esta hipótesis, se co-transfectaron células γ 2A con las construcciones de JAK2 normal o mutante junto con el vector que contiene el ADNc de STAT5A. Pasadas las 24 horas se extrajo el ARN para determinar mediante qRT-PCR los niveles de expresión transcripcional de *LMO2*. Los resultados revelaron que la mayoría de los mutantes ya no eran capaces de inducir subidas de expresión de *LMO2* significativas con respecto a la proteína normal. Únicamente el mutante H574R mantenía una subida significativa con respecto a JAK2 normal. Sorprendentemente, el mutante R683G inducía ahora unos niveles de expresión de *LMO2* algo menores que los de la proteína JAK2 no mutada ([Figura 31](#)).

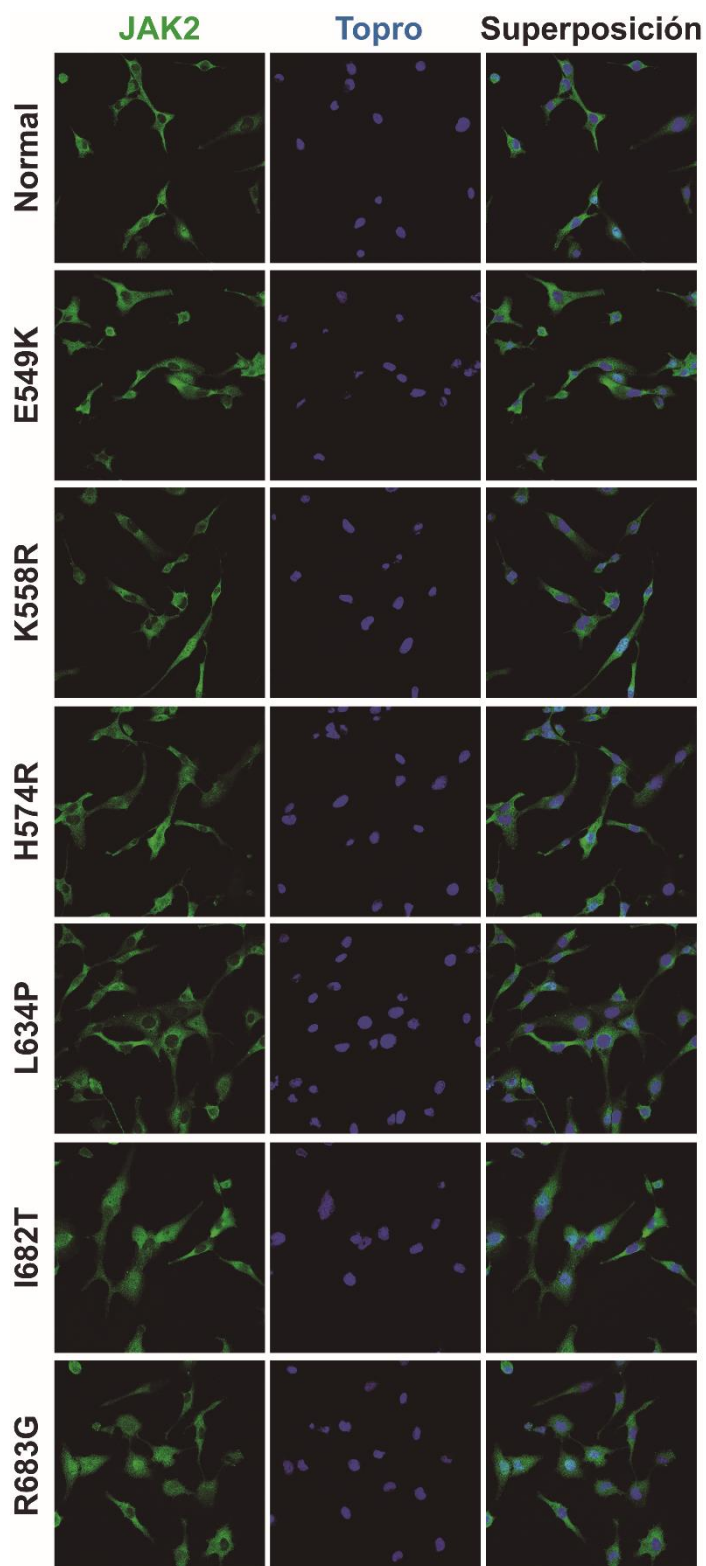


Figura 29. Localización sub-celular de JAK2 por inmunofluorescencia en las células γ 2A transfectadas transitoriamente. Imágenes representativas de microscopía confocal de las células γ 2A transfectadas con JAK2 (normal o mutantes). La proteína JAK2 se observa en color verde y los núcleos teñidos con TO-PRO-3 en color azul.

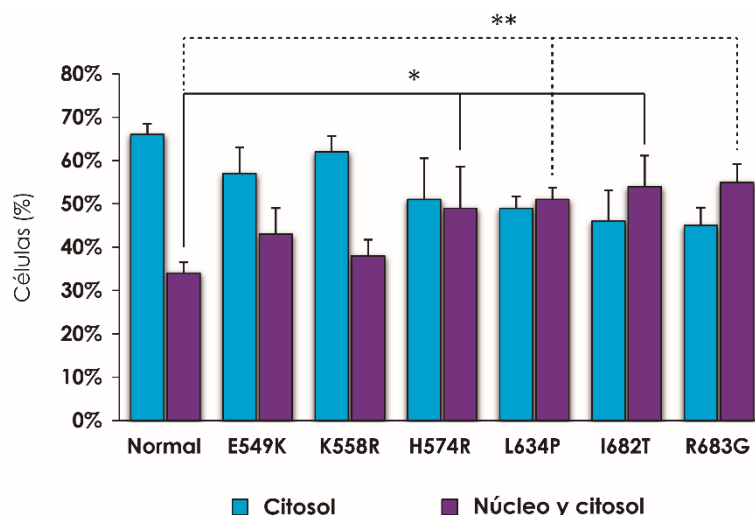


Figura 30. Estimación del número de células γ 2A transfectadas transitoriamente con JAK2 en el núcleo. Histograma de barras que muestra el porcentaje de células con JAK2 citosólico o JAK2 nuclear y citosólico en cada una de las transfecciones. Se contaron 300 células de diferentes imágenes obtenidas mediante microscopia confocal y elegidas aleatoriamente para cada una de las condiciones y ensayo. Los valores representados son la media de tres ensayos independientes y las barras de error indican la desviación típica; la significación de las diferencias se indica con asteriscos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

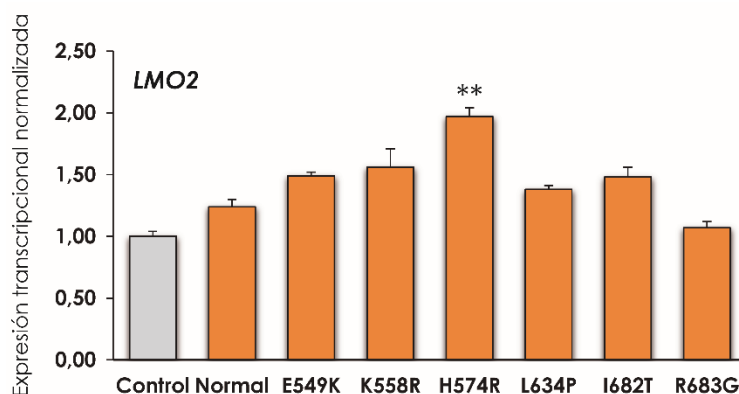


Figura 31. Expresión transcripcional del gen *LMO2* en las células γ 2A transfectadas transitoria y simultáneamente con JAK2 y STAT5A. El histograma de barras muestra los niveles de expresión del gen *LMO2* en las células γ 2A co-transfectadas con el ADNc de JAK2 (normal o mutado) y el ADNc de STAT5A. Los datos se obtuvieron mediante qRT-PCR y los niveles de *LMO2* se normalizaron con respecto a los del gen *B2-M*. Cada valor representa la media de tres ensayos independientes, cada uno de ellos por triplicado. Las barras de error muestran la desviación típica, y la significación estadística se indica con asteriscos: ** $p < 0.01$.

El siguiente paso fue comprobar qué sucedía con la localización sub-celular de JAK2 en las co-transfecciones transitorias con los ADNcs de *STAT5A* y *JAK2*. Curiosamente la adición de *STAT5A* a las células γ 2A supuso que todas las proteínas mutantes, e incluso la proteína JAK2 normal, se localizaran preferentemente en el citosol, y el porcentaje de células con señal nuclear y citosólica descendía significativamente. El descenso más acusado correspondió al mutante R683G, que pasó a tener niveles más bajos de representación nuclear que los de la proteína normal (**Figura 32** y **Figura 33**).

8.4.- Existe una correlación entre los niveles de expresión de JAK2 y LMO2 en los tres T-LBLs primarios con mutaciones en JAK2.

Dado que las mutaciones halladas en *JAK2* son capaces de inducir la expresión transcripcional de *LMO2* en las células γ 2A, quisimos comprobar si los tres linfomas primarios afectados por las mutaciones o por la translocación presentaban también niveles alterados de la expresión de *JAK2* y *LMO2*. Para ello se analizaron los niveles de ARNm de ambos genes en las muestras de T-LBLs mediante qRT-PCR. Los resultados revelaron que los tres tumores analizados presentaban un aumento significativo de la expresión de *JAK2* y *LMO2* (**Figura 34**), existiendo además una buena correlación entre los niveles de expresión de ambos genes. De este modo, el tumor #734 que es el que muestra los niveles más bajos de *JAK2*, también es el que menos expresa *LMO2*. Por el contrario, el tumor #829 es el tumor que tiene los niveles de expresión más elevados en ambos genes.

A continuación estudiamos la distribución sub-celular de JAK2 en los tumores primarios mediante análisis inmunohistoquímico. Estos análisis se realizaron en los dos únicos tumores (#460 y #238) de los que teníamos secciones congeladas de tejido fresco. Afortunadamente uno de ellos, el tumor #460 era portador de mutaciones en *JAK2* y el #238 no presenta ninguna mutación en este gen. Los resultados del análisis inmunohistoquímico revelaron que el 8.9% de las células del tumor #460 tienen JAK2 en el núcleo frente al 3.1% de las del tumor #238 (**Figura 35**).

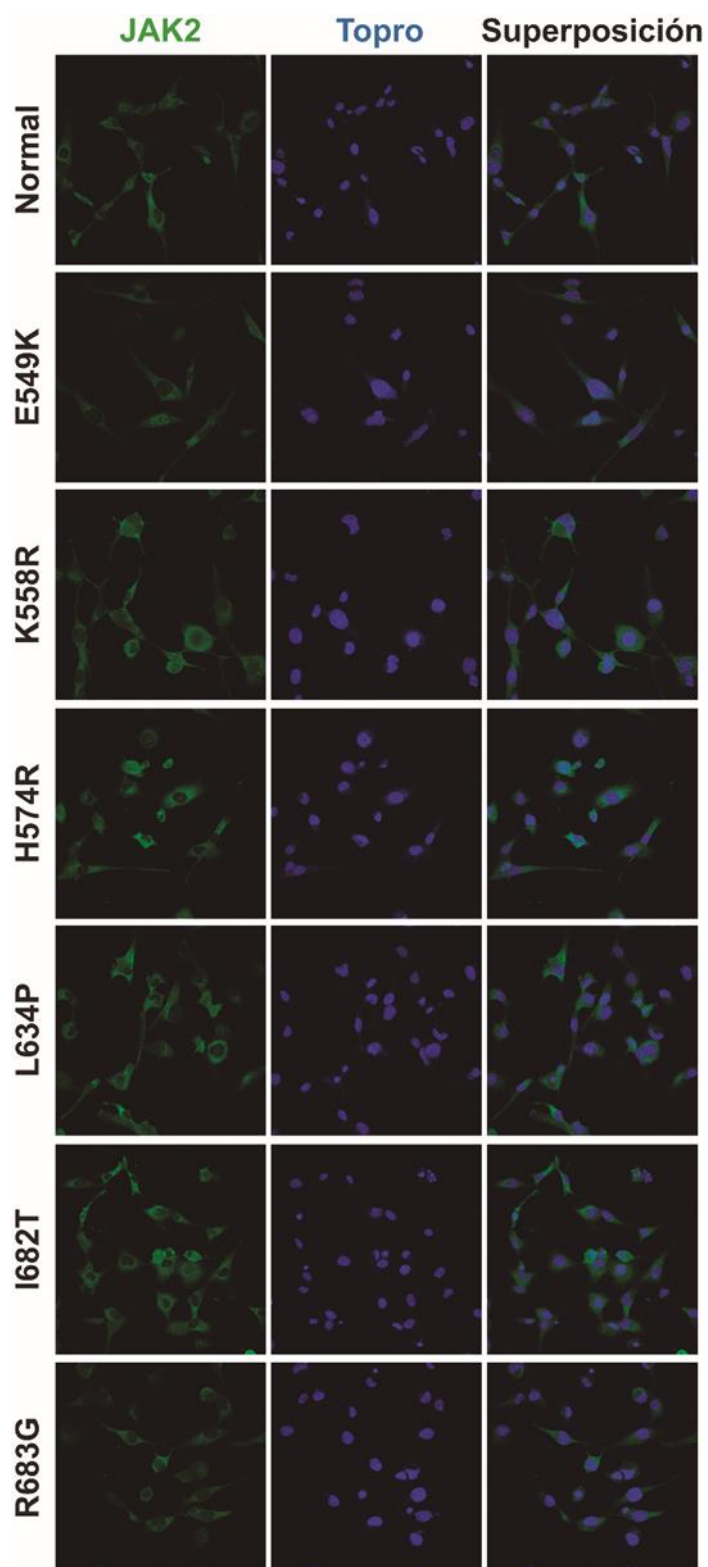


Figura 32. Localización sub-celular de JAK2 en las células γ 2A cotransfectadas transitoriamente con JAK2 y STAT5A. Imágenes representativas de microscopía confocal que muestran la distribución sub-celular de las proteínas JAK2 (normal o mutante) en las células γ 2A co-transfectadas con JAK2 y el ADNc de STAT5A. La proteína JAK2 se observa en color verde y los núcleos teñidos con TO-PRO-3 en color azul.

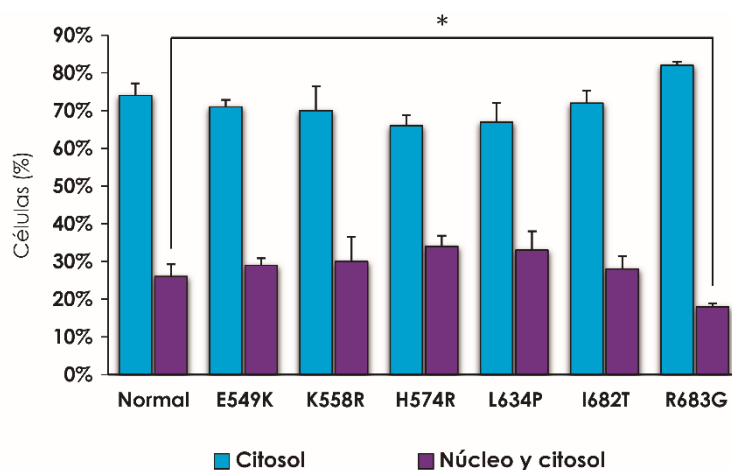


Figura 33. Distribución sub-celular de JAK2 en las células γ 2A co-transfectadas transitoriamente con JAK2 y STAT5A. El histograma de barras muestra el porcentaje de células con JAK2 citosólico o JAK2 nuclear y citosólico en cada una de las transfecciones. Se contaron 300 células de diferentes imágenes obtenidas mediante microscopía confocal, tomadas aleatoriamente en cada una de las condiciones y ensayos. Los valores representados son la media de tres ensayos independientes y las barras de error indican la desviación típica; la significación de las diferencias se indica con asterisco: * $p < 0.05$.

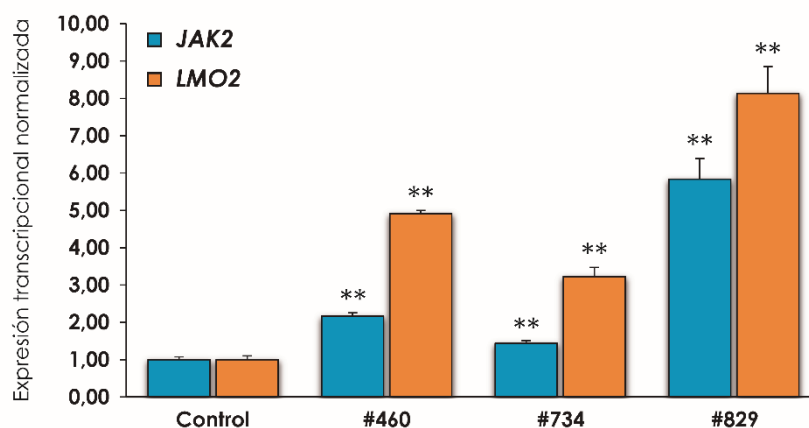


Figura 34. Expresión transcripcional de los genes JAK2 y LMO2 en los T-LBLs con mutaciones en JAK2. Los niveles de ARNm de JAK2 y LMO2 se cuantificaron por qRT-PCR y los resultados de expresión de ambos genes se normalizaron con el gen que codifica para B2-M. En la gráfica se muestra la media de tres valores y las barras de error la desviación típica; la significación estadística se indica con asteriscos: ** $p < 0.01$.

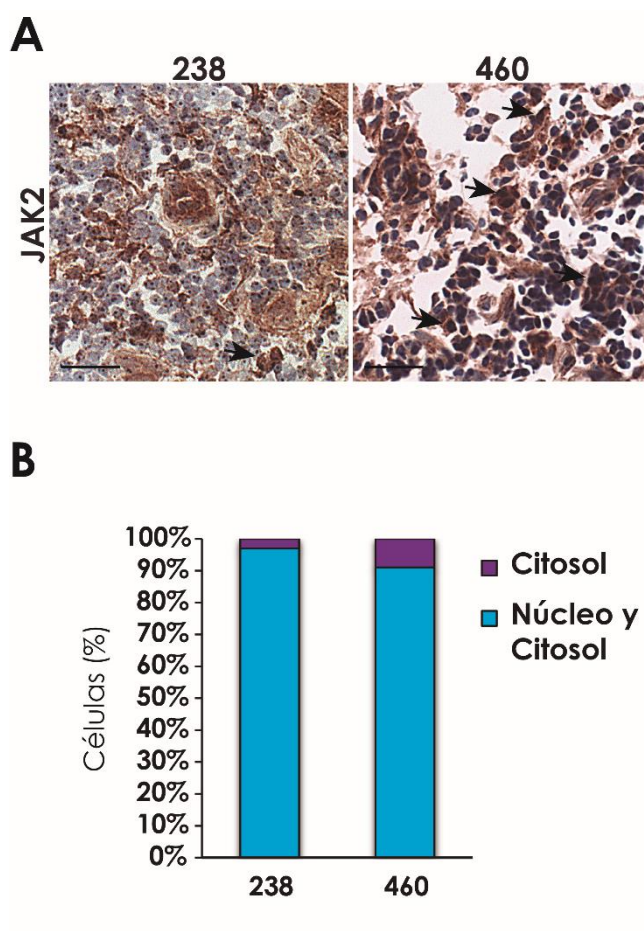


Figura 35. Localización sub-celular de JAK2 en los tumores #238 y #460. (A) Imágenes representativas del análisis inmunohistoquímico en los dos tumores primarios. Las flechas indican células con presencia de JAK2 en el núcleo. La barra indica 50 μm (B) Representación en histograma de barras de los porcentajes de células con JAK2 nuclear y citosólico.



Discusión

1.- Las mutaciones en el gen JAK2 son un evento significativo en el desarrollo de los T-LBLs.

El descubrimiento de las mutaciones y translocaciones activantes de JAK2 ha supuesto una contribución muy relevante para el diagnóstico y tratamiento de muchos tipos de cánceres. De hecho, se han identificado ya más de treinta mutaciones en el dominio JH2 en diversos tipos de neoplasias hematológicas (Decker y Müller; Ho *et al.*, 1999). Sin embargo, la implicación de este gen en los T-LBLs se reduce a la identificación de una translocación TEL-JAK2 que generaba una onco-proteína de fusión (Lacronique *et al.*, 1997). Esta alteración consistía en una translocación t(9;12)(p24;p13) que supone la activación constitutiva de la vía JAK-STAT. Este tipo de translocaciones TEL-JAK2 se han encontrado después en pacientes con T-ALL, en casos de leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), y en leucemia mieloide crónica atípica (aCML) (Peeters *et al.*, 1997). El descubrimiento de la mutación V617F en pacientes con policitemia vera (Baxter *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005), supuso el comienzo en la identificación de muchas otras mutaciones puntuales del gen JAK2 en las neoplasias hematológicas. Por tanto, el objetivo central de esta tesis fue realizar un análisis, más detallado y con mayor profundidad de lo que se había hecho hasta el momento, de las posibles alteraciones en la secuencia o en los niveles de expresión de JAK2 en los linfomas linfoblásticos de células T (T-LBLs), en el contexto de una medicina individualizada de precisión, para valorar en su justa medida la contribución de este gen al desarrollo de este tipo de linfomas.

Dado que se trata de una enfermedad rara se han podido analizar sólo 16 muestras de T-LBLs, aunque representativas de linfomas pediátricos y adultos, y de diferentes subtipos de la enfermedad. Nuestros resultados evidenciaron que uno de los tumores (#829) procedente de un paciente adulto con T-LBL proT inmaduro tenía una translocación TEL-JAK2, que contenía el dominio de oligomerización de TEL y el dominio quinasa de JAK2 (JH1) (Figura 10). Esta translocación supone la activación constitutiva de la proteína y, por tanto, de la vía JAK-STAT como se evidencia por los altos niveles de proteína STAT5 fosforilada (pSTAT5) (Figura 12). Curiosamente, la biopsia del paciente #829 expresa una combinación de marcadores característicos de células T y de células mieloides (CD3⁺, CD1a⁺ y MPO⁺; Tabla Suplementaria 1) (Schwaller *et al.*, 1998), que coincide con el hecho

de que los trasplantes de médula ósea en ratón con células que sobre-expresan la proteína de fusión TEL-JAK2 producen la proliferación combinada de células mieloides y células T (Schwaller *et al.*, 1998).

Además de la translocación, nuestros análisis permitieron demostrar la existencia de seis mutaciones de cambio de sentido (*missense*) en el gen JAK2 en dos tumores pediátricos (#460 y #734). En concordancia con otros estudios (Lee *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Mullighan, Zhang *et al.*, 2009; Tefferi, 2010), todas estas mutaciones se acumularon en el dominio pseudoquinasa de JAK2 (**Figura 13**) que actúa como regulador negativo del dominio quinasa (Saharinen *et al.*, 2000; Saharinen y Silvennoinen, 2002; Lee, 2013). De las seis mutaciones, tres no habían sido descritas previamente en este gen y una, R683G, había sido descrita con anterioridad en otros trabajos como una mutación activante de JAK2, afectando principalmente, a pacientes con leucemia linfoblástica aguda infantil de células B precursoras, asociada a Síndrome de Down. Esta mutación es capaz de inducir la proliferación celular de una línea proB de ratón con independencia de citoquina, ya que produce la activación constitutiva de la vía JAK-STAT sin necesidad de ligando (Bercovich *et al.*, 2008; Gaikwad *et al.*, 2009; Kearney *et al.*, 2009; Mullighan, Collins-Underwood *et al.*, 2009; Dusa *et al.*, 2010; Yoda *et al.*, 2010), y nos sirvió de referencia en nuestros análisis funcionales.

Curiosamente las mutaciones que presentaron nuestros linfomas se localizaron en los exones 13, 15 y 16 y no en los exones 12 o 14, donde han sido descritas en la gran mayoría de pacientes afectados por síndromes mieloproliferativos. De hecho, la mutación V617F que se encuentra en el exón 14 (James *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005) afecta a más del 90% de enfermos de policitemia vera (PV) y al 50-60% de casos con trombocitemia esencial (ET) y mielofibrosis primaria (PMF) (Levine *et al.*, 2005; Jones y Cross, 2013; Lee, 2013). Otros pacientes con síndromes mieloproliferativos presentan mutaciones en el exón 12 de JAK2 (Scott *et al.*, 2007; Pietra *et al.*, 2008; Schnittger *et al.*, 2009).

Cabe destacar que: (1) las seis mutaciones se encontraron repartidas en dos tumores, #460 y #734 (**Tabla 2**); (2) que ambos presentaron tres o más mutaciones distintas (todas con propiedades patogénicas) sugiriendo la existencia de heterogeneidad sub-clonal; y (3) que cada una de ellas se presenta con una frecuencia relativamente baja dentro de cada tumor (oscilando entre 1.80% y

21.6% de los transcritos según los datos de pirosecuenciación, o entre el 6.25% y el 14.28% según la secuenciación de clones). En cualquier caso, se podría estimar que el 39.17% de los transcritos en las células tumorales en el linfoma #460 y el 27.75% de las células tumorales en el #734 podrían tener al menos una mutación activante en JAK2 (ver [Tabla 2](#)). Se podría decir, por tanto, que en los T-LBLs con mutaciones en JAK2, habría un porcentaje significativo de células tumorales con una cierta "adicción" a la activación de la vía JAK-STAT a través de JAK2 (bien por la vía canónica o mediante la inducción de LMO2) pero no a ninguna mutación en concreto. Por otro lado, la proporción relativamente reducida de los transcritos mutantes podría explicar el hecho de que no se hayan descrito hasta la fecha mutaciones de JAK2 en este tipo de patologías (Flex *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2008; Asnafi *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

Por último, cabe señalar que los datos de pirosecuenciación ([Tabla 2](#)) revelaron que las mutaciones I682T y R683G del tumor #460 no se encontraban en el ADN genómico, pero sí en el transcriptoma sugiriendo la existencia de procesos de editado del ARN. Este mecanismo de edición del ARN consiste en el cambio de la secuencia de ARNm provocado por la desaminación de bases específicas de nucleótidos. La gran mayoría de los cambios producidos a través del editado del ARN consisten en un cambio de adenosina (A) a inosina. Esa inosina es entonces leída como guanosina (G), generándose el cambio de A→G. En mamíferos, este tipo de cambios son catalizados por miembros de la familia de enzimas adenosin-desaminasas ADAR, que está compuesta por tres miembros: ADAR1, ADAR2 y ADAR3. Tanto ADAR1 como ADAR2 se expresan en muchos tejidos, sin embargo la expresión de ADAR3 se limita al cerebro y además se considera que es una proteína inactiva (Smith *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 2012; Slotkin y Nishikura, 2013; Tomaselli *et al.*, 2014). El gen que codifica para ADAR2 se encuentra sobre-expresado en enfermedades principalmente de tipo neurológico (Slotkin y Nishikura, 2013; Tomaselli *et al.*, 2014), destacando su implicación en el desarrollo de astrocitomas a través del editado del ARNm del gen de la fosfatasa CDC14B (Galeano *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que otro miembro de la familia multigénica, ADAR1, es el responsable del editado del transcrito del gen *AZIN1* en carcinoma hepatocelular, de modo que el editado por ADAR1 produce una mayor proliferación celular en estos tumores (Chen *et al.*, 2013).

Otro tipo de editado del ARN, que se da con una frecuencia bastante menor, es el cambio de citidina a uridina (C→U), donde la uridina se lee como timidina. En este caso las enzimas responsables suelen pertenecer a la familia AID/APOBEC, que se compone por 11 miembros en humanos (Wedekind *et al.*, 2003; Rebhandl *et al.*, 2015). En el caso del ARNm del gen de la Apolipoproteína B (ApoB) se sabe que la proteína responsable de su editado es APOBEC-1 (Smith *et al.*, 1997; Wedekind *et al.*, 2003).

La información disponible por nuestro equipo indica que algunos de los genes pertenecientes a la familia AID/APOBEC (APOBEC-3C, APOBEC-3D y APOBEC-3G) están sobre-expresados en el linfoma #460 (datos no mostrados). De hecho, las enzimas APOBEC-3 son de gran importancia en la defensa innata del sistema inmune, ya que son responsables de la inhibición de retrovirus a través de la desaminación de las citosinas en el ADNc retroviral recién sintetizado (Harris y Liddament, 2004) y, en el caso del gen APOBEC-3B, existen pruebas de su sobre-expresión en tumores primarios de mama y en líneas celulares derivadas de cáncer de mama (Burns *et al.*, 2013; Rebhandl *et al.*, 2015).

Con respecto a la trascendencia de los mecanismos de editado del ARN en cáncer, sería interesante reseñar que en un exhaustivo trabajo, donde se compararon los datos de secuenciación del ARN completo con los del ADN genómico, se describieron un total de 22.688 cambios en el ARN, la mayoría en regiones no codificantes, pero un porcentaje considerable en secuencias codificantes (Peng *et al.*, 2012). Además, más del 90% de esos cambios eran del tipo A→G, como el que se produce en nuestra mutación R683G. En el caso de la mutación I682T se produce un cambio T→C, en una secuencia TCA, y se sabe que las proteínas APOBEC-3 actúan preferencialmente en motivos TCW (donde W puede ser A o T). Por tanto, ambas mutaciones podrían haberse producido por la desregulación de alguna de estas proteínas responsables del editado del ARN. Sin embargo, la confirmación experimental de este hecho requeriría análisis más profundos que no se han contemplado en esta tesis.

2.- Dos de las mutaciones identificadas, R683G y H574R, son capaces de activar constitutivamente la vía JAK-STAT y de permitir la proliferación de células BaF3-EpoR en ausencia de citoquina.

Los ensayos luciferasa realizados para comprobar el posible efecto de los mutantes sobre la activación de la vía JAK-STAT en las células γ 2A (**Figura 14**) revelaron que sólo dos de las mutaciones, R683G y H574R, fueron capaces de activar constitutivamente la vía. Nuestros resultados confirmaron que el mutante R683G es una mutación activante de JAK2 como ya habían sugerido trabajos anteriores (Bercovich *et al.*, 2008; Mullighan, Collins-Underwood *et al.*, 2009; Dusa *et al.*, 2010; Yoda *et al.*, 2010). De hecho el mutante R683G fue el que indujo los valores más elevados de actividad luciferasa.

Para profundizar algo más en el efecto funcional de estas dos mutaciones quisimos comprobar si eran capaces también de inducir la proliferación de las células BaF3-EpoR en ausencia de citoquina. En este ensayo la mutación R683G se tomó como un control positivo (**Figura 16A**) (Bercovich *et al.*, 2008; Mullighan, Collins-Underwood *et al.*, 2009; Dusa *et al.*, 2010; Yoda *et al.*, 2010). Curiosamente, aunque las células BaF3-EpoR portadoras de la mutación H574R no fueron capaces de proliferar en la misma medida que las R683G, el perfil de proliferación en ausencia de Epo estaba claramente por encima del de las células con JAK2 normal. Además, los datos de viabilidad celular (**Figura 16B**) demostraron que las células con H574R mantenían unos porcentajes de viabilidad superiores a los de las células con JAK2 normal durante todo el ensayo. Las diferencias observadas en los niveles de proteína JAK2 fosforilada en respuesta a un estímulo con Epo tras la privación (**Figura 18**) indican que el mutante H574R presenta una hipersensibilidad al estímulo con Epo similar a la de la mutación R683G. Por tanto, se podría decir que en el tumor #460 la mutación R683G estaría produciendo la activación constitutiva de la vía JAK-STAT, incluso en ausencia de citoquinas en el microambiente tumoral. Y, en el caso del tumor #734, las células tumorales con la mutación H574R tendrían una ventaja proliferativa con respecto a aquellas que portaran el gen normal, sobre todo en un microambiente con citoquinas.

3.- La metilación del promotor del gen *SOCS3* es un evento frecuente en los T-LBLs y podría actuar potenciando los efectos de las mutaciones activantes.

La vía JAK-STAT es una de las principales vías de señalización celular y, como tal, tiene múltiples elementos o sistemas de regulación que actúan a diferentes niveles. Dentro de los elementos reguladores negativos se encuentra la familia de proteínas supresoras de la señalización por citoquinas (SOCS). La activación transcripcional de los genes *SOCS* se produce por las propias STATs, en lo que sería un claro ejemplo de retroalimentación negativa (Alexander, 2002; Shuai y Liu, 2003; Inagaki-Ohara *et al.*, 2013). Otros reguladores negativos son las fosfatasa encargadas de regular la fosforilación de las quinasas JAKs, como la fosfatasa SHP1 y SHP2 (Shuai y Liu, 2003; Salmond y Alexander, 2006).

A diferencia de lo que sucede en los genes JAKs, donde el principal mecanismo que provoca su desregulación son las alteraciones genéticas, principalmente mutaciones y translocaciones (Jatiani *et al.*, 2010), los reguladores negativos como, *SOCS1*, *SOCS3* y *SHP1* se ven afectados por mecanismos de silenciamiento epigenético a través de la hipermetilación de sus promotores. Varios trabajos han relacionado la hipermetilación de los promotores de *SOCS1*, *SOCS3* y *SHP1* con el desarrollo de tumores. *SHP1* se ha encontrado silenciado epigenéticamente en linfomas y leucemias (Zhang *et al.*, 2000; Oka *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003); el promotor de *SOCS1* se ha encontrado hipermetilado en células de leucemia mieloide aguda (AML) (Ekmekci *et al.*, 2004), y por último el promotor de *SOCS3* está hipermetilado en un 90% de los tumores de cabeza y cuello (Weber *et al.*, 2005).

Nuestro primer análisis se centró en estudiar el estado global de metilación de los promotores de *SHP1*, *SOCS1* y *SOCS3* mediante MSP en las muestras de los tres pacientes portadores de mutaciones activantes en *JAK2* (#460, #734 y #829) (Figura 20). Curiosamente, los tres tumores mostraron el mismo perfil: ninguno tenía los promotores de *SHP1* y *SOCS1* metilados, mientras que todos tenían hipermetilado el promotor del gen *SOCS3*. La densidad de metilación de la región del promotor de *SOCS3* metilada, se estimó mediante la secuenciación de ADN modificado con bisulfito. Los resultados confirmaron que el promotor de *SOCS3* se

encontraba significativamente hipermetilado con respecto a los timos fetales utilizados como control (**Figura 21**), siendo el tumor #460 el que dio los valores de densidad más bajos, aunque claramente superiores al punto de corte crítico estimado en un 15% (Kuang *et al.*, 2010). La hipermetilación del promotor de SOCS3 se extendía, no obstante, a muchos de los linfomas con JAK2 normal (**Figura 23**). Es decir, la inmensa mayoría de los linfomas analizados, con independencia de que fuesen o no portadores de mutaciones en JAK2, tendrían anulado el control negativo que ejerce normalmente la presencia de las cantidades apropiadas de proteína SOCS3. Las consecuencias funcionales de la hipermetilación de SOCS3 se comprobaron en dos líneas celulares derivadas de leucemias/linfomas linfoblásticos de células T, Jurkat y Molt-4 (**Figura 25**).

4.- Todas las mutaciones de cambio de sentido halladas en el gen JAK2 son capaces de activar la expresión del oncogén LMO2 a través de una vía no canónica.

El descubrimiento de que JAK2 era capaz de entrar en el núcleo de las células de los islotes pancreáticos en el año 1995 (Sorenson y Stout, 1995) pasó relativamente desapercibido, hasta que en el año 2009 el grupo del Dr. Kouzarides fue capaz de atribuirle una función específica a la presencia de JAK2 en el núcleo. En el núcleo, JAK2 era capaz de fosforilar a la histona 3 en su tirosina 41 (H3Y41) y esto producía el desplazamiento de la proteína represora de heterocromatina HP1 α de su unión a la cromatina (Dawson *et al.*, 2009), causando así la activación de la expresión de varios genes que se encontraban reprimidos, entre los que se encontraba el oncogén LMO2. En este trabajo se demostró que el mutante de JAK2 V617F era capaz de entrar en el núcleo de algunas células hematopoyéticas (Dawson *et al.*, 2009) sin embargo, en otro trabajo posterior se demostró que el mutante V617F se encontraba en el núcleo con mayor frecuencia que la proteína normal en las células K562 transfectadas (Rinaldi *et al.*, 2010). Además, se comprobó que en las células con la mutación V617F procedentes de la médula ósea de pacientes con síndromes mieloproliferativos la proteína mutante de JAK2 se acumulaba en el núcleo, especialmente en la fracción de células CD34⁺.

La proteína LMO2 (*LIM domain only 2*) pertenece a una familia de proteínas compuesta por cuatro miembros que actúan regulando eventos transcripcionales a través de la formación de complejos de transcripción con múltiples proteínas que participan en procesos de diferenciación (Bach, 2000), pero también se conoce su implicación en procesos de oncogénesis (Rabbitts, 1998). El gen *LMO2* se expresa ampliamente en tejidos embrionarios y adultos, pero donde mejor se conoce su papel es en la regulación de la hematopoyesis. De hecho, los ratones deficientes para *LMO2* mueren al noveno o décimo día del desarrollo embrionario por un fallo en la eritropoyesis del saco vitelino (Nam y Rabbitts, 2006; Matthews *et al.*, 2013). La activación del oncogén *LMO2* puede suceder por translocaciones que afectan a aproximadamente el 9% de los casos de T-ALLs infantiles (Rabbitts, 1998; Nam y Rabbitts, 2006; Matthews *et al.*, 2013). También se ha demostrado que el gen *LMO2* se sobre-expresa en casos de enfermos con inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X (SCID-X1), como consecuencia de los tratamientos mediante terapia génica (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003; Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2008; Howe *et al.*, 2008). Por otro lado, la sobre-expresión de *LMO2* en ratones transgénicos acaba produciendo, tras un largo período de latencia, la aparición de T-ALL en los ratones (Matthews *et al.*, 2013) que acumulaban timocitos doble negativos 3 (DN3) con una elevada tasa de auto-renovación.

Dado que en nuestro trabajo hemos hallado nuevas mutaciones del gen *JAK2*, quisimos comprobar si alguna de las nuevas mutaciones eran capaces de afectar a la distribución sub-celular de *JAK2* y a los niveles de expresión transcripcional del gen *LMO2*. Los análisis realizados en las células γ 2A, transfectadas con la proteína normal o los mutantes, revelaron que todas las proteínas mutantes aumentaban de manera significativa los niveles de ARNm del gen *LMO2* en comparación con la proteína normal (**Figura 27**). A continuación, comprobamos si existía una relación entre el aumento de las proteínas mutantes en el núcleo de las células γ 2A y la subida de expresión de *LMO2*. Los análisis mediante inmunofluorescencia de la proteína *JAK2* revelaron que todos los mutantes tenían mayor proporción de células con *JAK2* nuclear, y esas diferencias fueron significativas en el caso de cuatro de los seis mutantes (H574R, L634P, I682T y R683G) (**Figura 29** y **Figura 30**).

Dado que las células $\gamma 2A$ son también deficientes en STAT5 y que JAK2 no tiene señales propias de localización nuclear, el siguiente paso fue averiguar qué efecto podría tener la transfección conjunta de JAK2 y STAT5A en los niveles de expresión transcripcional del gen *LMO2*. Los resultados revelaron que la adición de STAT5A hacía que los mutantes ya no fuesen capaces de inducir una subida significativa en los niveles de ARNm de *LMO2* con respecto a la proteína normal (**Figura 31**). Este efecto fue menos acusado en el caso del mutante H574R que aún seguía teniendo unos valores de expresión transcripcional de *LMO2* significativamente superiores a los de la proteína normal. Curiosamente el mutante R683G, que se había mostrado como el más eficaz activando la vía canónica JAK-STAT, mostró unos valores de expresión de *LMO2* incluso menores que los de la proteína JAK2 normal.

La distribución sub-celular de la proteína JAK2 en las células $\gamma 2A$ co-transfectadas con JAK2 y STAT5A fue determinada también mediante inmunofluorescencia. Las imágenes evidenciaron que en todas las transfecciones (incluida la de la proteína normal) el porcentaje de células con JAK2 nuclear descendía considerablemente, pasando a tener una localización citosólica preferentemente (**Figura 32** y **Figura 33**). El mutante R683G fue el que experimentó la mayor bajada, pasando de un 55% de células con la proteína mutante en el núcleo en los ensayos sin transfectar STAT5A, a un 18% en los ensayos donde se co-transfectaron JAK2 y STAT5A, de modo que los valores fueron incluso significativamente inferiores con respecto a la proteína normal.

Aunque todavía se desconoce el mecanismo exacto por el que la proteína JAK2 es capaz de desplazarse al núcleo (ya que, como se ha dicho, carece de una señal de localización nuclear propia) nuestros datos sugieren que podría existir algún tipo de competencia entre la vía canónica y la no canónica inducidas por JAK2. De este modo, se podría especular que si la vía canónica se encontrara activada, la cantidad de proteína JAK2 disponible para ir al núcleo se vería reducida considerablemente. Sin embargo, no tenemos datos suficientes para confirmar esta hipótesis, y sería necesario realizar estudios adicionales que no se han contemplado en esta tesis.

5.- La contribución del gen JAK2 al desarrollo de los linfomas linfoblásticos de células T.

Hasta el momento ningún estudio había demostrado la implicación del gen JAK2 en el desarrollo de los linfomas linfoblásticos de células T, más allá del caso de una translocación TEL-JAK2 similar a la que hemos detectado en nuestro trabajo (Lacronique *et al.*, 1997). Sin embargo, sí hay estudios donde se demuestra su papel en leucemias linfoblásticas agudas de células T, bien por translocaciones (Lacronique *et al.*, 1997) o por mutaciones principalmente en T-ALLs asociadas a síndrome de Down (Bercovich *et al.*, 2008). En esta tesis se demuestra la participación del gen JAK2 en un número significativo de biopsias de T-LBLs, actuando a través de la vía canónica de señalización JAK-STAT, y/o a través de una vía no canónica mediante la inducción del oncogén LMO2. Además, uno de sus reguladores negativos, SOCS3, se encuentra silenciado mediante la metilación de su promotor en la gran mayoría de los linfomas.

En la figura siguiente se resumen las alteraciones de diferentes miembros de la vía y sus consecuencias funcionales (**Figura 36**). Teniendo en cuenta estos datos, el tratamiento con inhibidores de JAK2 (como el Ruxolitinib) en combinación con otras drogas demetilantes de ADN e inhibidores de deacetilasas de histonas, sería una terapia coadyuvante de elección en el tratamiento de una fracción significativa de T-LBLs.

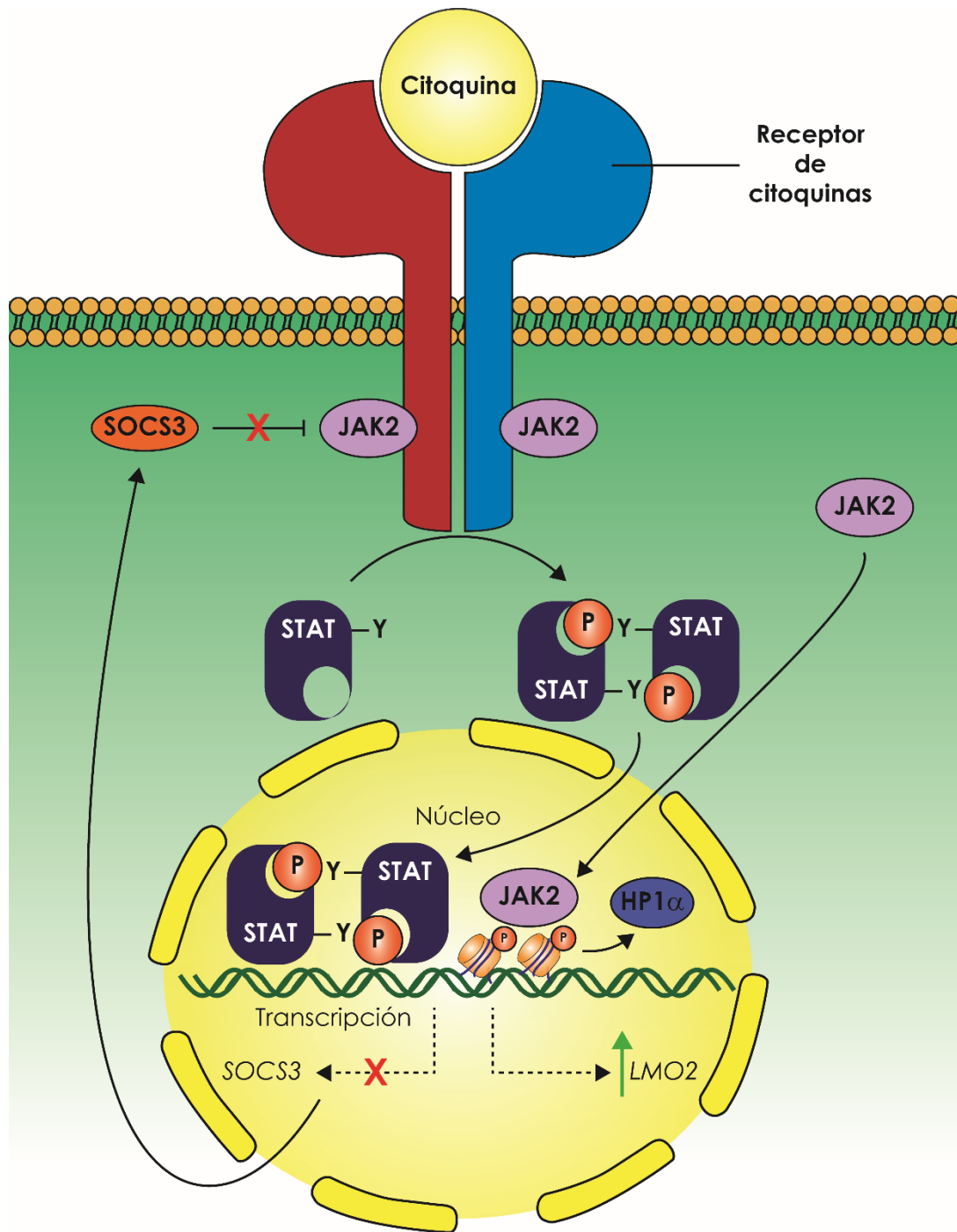


Figura 36. Papel de JAK2 en el desarrollo de los linfomas linfoblásticos de células T.



Conclusiones



1.- La vía JAK-STAT juega un papel importante en la proliferación, supervivencia y diferenciación de células progenitoras linfoides. Sin embargo, se sabe muy poco de la contribución de JAK2 al desarrollo de los linfomas linfoblásticos de células T (T-LBL). El análisis mutacional de este gen en una muestra de 16 T-LBLs, pediátricos o adultos, reveló que uno de los linfomas (#829) procedente de un paciente adulto con linfoma linfoblástico inmaduro presenta una translocación activante TEL-JAK2. Además, otros dos linfomas (#460 y #734) procedentes de dos pacientes pediátricos acumulan seis mutaciones de cambio de sentido (*missense*) en los exones 13, 15 y 16 de JAK2 que afectan a su dominio pseudoquinasa.

2.- Aunque la frecuencia de cada uno de los transcritos mutantes es relativamente baja, el número total de transcritos mutados en los linfomas #460 y #734 alcanza cifras significativas. La baja frecuencia de los transcritos mutantes individuales podría explicar el hecho de que no se hayan descrito hasta la fecha mutaciones de JAK2 en este tipo de patologías al utilizarse técnicas convencionales de secuenciación con menor profundidad de análisis que las aplicadas en este estudio.

3.- La presencia de más de tres transcritos diferentes en los linfomas #460 y #734 sugiere que ambas muestras podrían tener heterogeneidad sub-clonal.

4.- Los datos combinados de la secuenciación de clones y la pirosecuenciación sobre ADN genómico y ADNc revelaron que las mutaciones I682T y R683G del tumor #460 sólo se encuentran en el transcriptoma sugiriendo un posible mecanismo de editado del ARN.

5.- Los análisis funcionales mediante ensayos luciferasa y de proliferación celular demostraron que las mutaciones H574R y R683G son capaces de activar constitutivamente la vía JAK-STAT en la línea celular γ 2A (deficiente para JAK2), permitiendo además, la proliferación de la línea celular BaF3-EpoR en ausencia de citoquina (R683G) o confiriendo hipersensibilidad al estímulo con citoquina (H574R).

6.- Los análisis de metilación de los promotores de los genes reguladores negativos *SHP1*, *SOCS1* y *SOCS3* demostraron que sólo el promotor de *SOCS3* se encuentra hipermetilado en la mayor parte de los linfomas con independencia del estado mutacional de JAK2.

7.- Los tratamientos con el agente demetilante 5-aza-2'-deoxicitidina (AZA) y/o con el inhibidor de deacetilasas tricostatina A (TSA) en las células Jurkat y Molt-4, que tienen altos niveles de metilación de *SOCS3*, fueron capaces de reducir la metilación del promotor de este gen e incrementar sus niveles de expresión transcripcional mediante qRT-PCR.

8.- Las seis mutaciones de cambio de sentido fueron capaces de inducir la expresión del oncogén *LMO2* en las células γ 2A deficientes en JAK2 y STAT5. Sin embargo, la activación de la transcripción de *LMO2* a través de la vía no canónica de JAK2 se vio considerablemente reducida en presencia de STAT5A.

9.- Los T-LBLs primarios con mutaciones en *JAK2* o con la translocación TEL-*JAK2* sobre-expresan simultáneamente los genes *JAK2* y *LMO2*, y este efecto parece claramente co-relacionado con la mayor presencia de JAK2 en el núcleo de las células tumorales.

10.- Los datos obtenidos en esta tesis sugieren la conveniencia del uso combinado de inhibidores de JAK2 y drogas epigenéticas como agentes coadyuvantes en los protocolos actuales en una fracción significativa de este tipo de linfomas.



Bibliografía

Aifantis, I., Raetz, E. and Buonamici, S. (2008). "Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma." *Nat Rev Immunol* **8**(5): 380-390.

Alexander, W. S. (2002). "Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system." *Nat Rev Immunol* **2**(6): 410-416.

Asnafi, V., Le Noir, S., Lhermitte, L., Gardin, C., Legrand, F., Vallantin, X., Malfuson, J. V., Ifrah, N., Dombret, H. and Macintyre, E. (2010). "JAK1 mutations are not frequent events in adult T-ALL: a GRAALL study." *Br J Haematol* **148**(1): 178-179.

Bach, I. (2000). "The LIM domain: regulation by association." *Mech Dev* **91**(1-2): 5-17.

Balmain, A., Gray, J. and Ponder, B. (2003). "The genetics and genomics of cancer." *Nat Genet* **33 Suppl**: 238-244.

Basso, K., Mussolin, L., Lettieri, A., Brahmachary, M., Lim, W. K., Califano, A., Basso, G., Biondi, A., Cazzaniga, G. and Rosolen, A. (2011). "T-cell lymphoblastic lymphoma shows differences and similarities with T-cell acute lymphoblastic leukemia by genomic and gene expression analyses." *Genes Chromosomes Cancer* **50**(12): 1063-1075.

Baxter, E. J., Scott, L. M., Campbell, P. J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G. S., Bench, A. J., Boyd, E. M., Curtin, N., Scott, M. A., Erber, W. N., Green, A. R. and Cancer Genome, P. (2005). "Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders." *Lancet* **365**(9464): 1054-1061.

Bercovich, D., Ganmore, I., Scott, L. M., Wainreb, G., Birger, Y., Elimelech, A., Shochat, C., Cazzaniga, G., Biondi, A., Basso, G., Cario, G., Schrappe, M., Stanulla, M., Strehl, S., Haas, O. A., Mann, G., Binder, V., Borkhardt, A., Kempski, H., Trka, J., Bielorei, B., Avigad, S., Stark, B., Smith, O., Dastugue, N., Bourquin, J. P., Tal, N. B., Green, A. R. and Izraeli, S. (2008). "Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome." *Lancet* **372**(9648): 1484-1492.

Bonn, B. R., Rohde, M., Zimmermann, M., Krieger, D., Oschlies, I., Niggli, F., Wrobel, G., Attarbaschi, A., Escherich, G., Klapper, W., Reiter, A. and Burkhardt, B. (2013). "Incidence and prognostic relevance of genetic variations in T-cell lymphoblastic lymphoma in childhood and adolescence." *Blood* **121**(16): 3153-3160.

Bueno, M. J., Gomez de Cedron, M., Gomez-Lopez, G., Perez de Castro, I., Di Lisio, L., Montes-Moreno, S., Martinez, N., Guerrero, M., Sanchez-Martinez, R., Santos, J., Pisano, D. G., Piris, M. A., Fernandez-Piqueras, J. and Malumbres, M. (2011). "Combinatorial effects of microRNAs to suppress the Myc oncogenic pathway." *Blood* **117**(23): 6255-6266.

Bueno, M. J., Gomez de Cedron, M., Laresgoiti, U., Fernandez-Piqueras, J., Zubiaga, A. M. and Malumbres, M. (2010). "Multiple E2F-induced microRNAs prevent replicative stress in response to mitogenic signaling." *Mol Cell Biol* **30**(12): 2983-2995.

Bueno, M. J., Perez de Castro, I., Gomez de Cedron, M., Santos, J., Calin, G. A., Cigudosa, J. C., Croce, C. M., Fernandez-Piqueras, J. and Malumbres, M. (2008). "Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression." *Cancer Cell* **13**(6): 496-506.

Burkhardt, B. (2010). "Paediatric lymphoblastic T-cell leukaemia and lymphoma: one or two diseases?" *Br J Haematol* **149**(5): 653-668.

- Burns, M. B., Lackey, L., Carpenter, M. A., Rathore, A., Land, A. M., Leonard, B., Refsland, E. W., Kotandeniya, D., Tretyakova, N., Nikas, J. B., Yee, D., Temiz, N. A., Donohue, D. E., McDougles, R. M., Brown, W. L., Law, E. K. and Harris, R. S. (2013). "APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer." *Nature* **494**(7437): 366-370.
- Chen, L., Li, Y., Lin, C. H., Chan, T. H., Chow, R. K., Song, Y., Liu, M., Yuan, Y. F., Fu, L., Kong, K. L., Qi, L., Li, Y., Zhang, N., Tong, A. H., Kwong, D. L., Man, K., Lo, C. M., Lok, S., Tenen, D. G. and Guan, X. Y. (2013). "Recoding RNA editing of AZIN1 predisposes to hepatocellular carcinoma." *Nat Med* **19**(2): 209-216.
- Dawson, M. A., Bannister, A. J., Gottgens, B., Foster, S. D., Bartke, T., Green, A. R. and Kouzarides, T. (2009). "JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin." *Nature* **461**(7265): 819-822.
- Dawson, M. A. and Kouzarides, T. (2012). "Cancer epigenetics: from mechanism to therapy." *Cell* **150**(1): 12-27.
- de Leval, L., Bisig, B., Thielen, C., Boniver, J. and Gaulard, P. (2009). "Molecular classification of T-cell lymphomas." *Crit Rev Oncol Hematol* **72**(2): 125-143.
- Decker, T. and Müller, M. Jak-Stat Signaling : From Basics to Disease [XIV, 450 p.
- Dusa, A., Mouton, C., Pecquet, C., Herman, M. and Constantinescu, S. N. (2010). "JAK2 V617F constitutive activation requires JH2 residue F595: a pseudokinase domain target for specific inhibitors." *PLoS One* **5**(6): e11157.
- Ekmekci, C. G., Gutierrez, M. I., Siraj, A. K., Ozbek, U. and Bhatia, K. (2004). "Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia." *Am J Hematol* **77**(3): 233-240.
- Elliott, J., Suessmuth, Y., Scott, L. M., Nahlik, K., McMullin, M. F., Constantinescu, S. N., Green, A. R. and Johnston, J. A. (2009). "SOCS3 tyrosine phosphorylation as a potential bio-marker for myeloproliferative neoplasms associated with mutant JAK2 kinases." *Haematologica* **94**(4): 576-580.
- Esteller, M. (2007). "Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps." *Nat Rev Genet* **8**(4): 286-298.
- Esteller, M. (2008). "Epigenetics in cancer." *N Engl J Med* **358**(11): 1148-1159.
- Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B. and Herman, J. G. (2001). "A gene hypermethylation profile of human cancer." *Cancer Res* **61**(8): 3225-3229.
- Feinberg, A. P., Ohlsson, R. and Henikoff, S. (2006). "The epigenetic progenitor origin of human cancer." *Nat Rev Genet* **7**(1): 21-33.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). "Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts." *Nature* **301**(5895): 89-92.
- Ferrando, A. A., Herblot, S., Palomero, T., Hansen, M., Hoang, T., Fox, E. A. and Look, A. T. (2004). "Biallelic transcriptional activation of oncogenic transcription factors in T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Blood* **103**(5): 1909-1911.

Ferrando, A. A., Neuberg, D. S., Staunton, J., Loh, M. L., Huard, C., Raimondi, S. C., Behm, F. G., Pui, C. H., Downing, J. R., Gilliland, D. G., Lander, E. S., Golub, T. R. and Look, A. T. (2002). "Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia." *Cancer Cell* **1**(1): 75-87.

Flex, E., Petrangeli, V., Stella, L., Chiaretti, S., Hornakova, T., Knoops, L., Ariola, C., Fodale, V., Clappier, E., Paoloni, F., Martinelli, S., Fragale, A., Sanchez, M., Tavolaro, S., Messina, M., Cazzaniga, G., Camera, A., Pizzolo, G., Tornesello, A., Vignetti, M., Battistini, A., Cave, H., Gelb, B. D., Renauld, J. C., Biondi, A., Constantinescu, S. N., Foa, R. and Tartaglia, M. (2008). "Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia." *J Exp Med* **205**(4): 751-758.

Fourouclas, N., Li, J., Gilby, D. C., Campbell, P. J., Beer, P. A., Boyd, E. M., Goodeve, A. C., Bareford, D., Harrison, C. N., Reilly, J. T., Green, A. R. and Bench, A. J. (2008). "Methylation of the suppressor of cytokine signaling 3 gene (SOCS3) in myeloproliferative disorders." *Haematologica* **93**(11): 1635-1644.

Gaikwad, A., Rye, C. L., Devidas, M., Heerema, N. A., Carroll, A. J., Izraeli, S., Plon, S. E., Basso, G., Pession, A. and Rabin, K. R. (2009). "Prevalence and clinical correlates of JAK2 mutations in Down syndrome acute lymphoblastic leukaemia." *Br J Haematol* **144**(6): 930-932.

Galeano, F., Rossetti, C., Tomaselli, S., Cifaldi, L., Lezzerini, M., Pezzullo, M., Boldrini, R., Massimi, L., Di Rocco, C. M., Locatelli, F. and Gallo, A. (2013). "ADAR2-editing activity inhibits glioblastoma growth through the modulation of the CDC14B/Skp2/p21/p27 axis." *Oncogene* **32**(8): 998-1009.

Gonzalez-Gugel, E., Villa-Morales, M., Santos, J., Bueno, M. J., Malumbres, M., Rodriguez-Pinilla, S. M., Piris, M. A. and Fernandez-Piqueras, J. (2013). "Down-regulation of specific miRNAs enhances the expression of the gene Smoothed and contributes to T-cell lymphoblastic lymphoma development." *Carcinogenesis* **34**(4): 902-908.

Haan, S., Ferguson, P., Sommer, U., Hiremath, M., McVicar, D. W., Heinrich, P. C., Johnston, J. A. and Cacalano, N. A. (2003). "Tyrosine phosphorylation disrupts elongin interaction and accelerates SOCS3 degradation." *J Biol Chem* **278**(34): 31972-31979.

Haber, D. and Harlow, E. (1997). "Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age." *Nat Genet* **16**(4): 320-322.

Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., Asnafi, V., MacIntyre, E., Dal Cortivo, L., Radford, I., Brousse, N., Sigaux, F., Moshous, D., Hauer, J., Borkhardt, A., Belohradsky, B. H., Wintergerst, U., Velez, M. C., Leiva, L., Sorensen, R., Wulffraat, N., Blanche, S., Bushman, F. D., Fischer, A. and Cavazzana-Calvo, M. (2008). "Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1." *J Clin Invest* **118**(9): 3132-3142.

Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A. and Cavazzana-Calvo, M. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." *Science* **302**(5644): 415-419.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.

Harris, R. S. and Liddament, M. T. (2004). "Retroviral restriction by APOBEC proteins." Nat Rev Immunol **4**(11): 868-877.

He, R. J., Yu, Z. H., Zhang, R. Y. and Zhang, Z. Y. (2014). "Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets." Acta Pharmacol Sin **35**(10): 1227-1246.

Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D. and Baylin, S. B. (1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9821-9826.

Ho, J. M., Beattie, B. K., Squire, J. A., Frank, D. A. and Barber, D. L. (1999). "Fusion of the ets transcription factor TEL to Jak2 results in constitutive Jak-Stat signaling." Blood **93**(12): 4354-4364.

Hookham, M. B., Elliott, J., Suessmuth, Y., Staerk, J., Ward, A. C., Vainchenker, W., Percy, M. J., McMullin, M. F., Constantinescu, S. N. and Johnston, J. A. (2007). "The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3." Blood **109**(11): 4924-4929.

Howe, S. J., Mansour, M. R., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C., Hubank, M., Kempinski, H., Brugman, M. H., Pike-Overzet, K., Chatters, S. J., de Ridder, D., Gilmour, K. C., Adams, S., Thornhill, S. I., Parsley, K. L., Staal, F. J., Gale, R. E., Linch, D. C., Bayford, J., Brown, L., Quaye, M., Kinnon, C., Ancliff, P., Webb, D. K., Schmidt, M., von Kalle, C., Gaspar, H. B. and Thrasher, A. J. (2008). "Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients." J Clin Invest **118**(9): 3143-3150.

Hunter, T. (1997). "Oncoprotein networks." Cell **88**(3): 333-346.

Illingworth, R. S. and Bird, A. P. (2009). "CpG islands--'a rough guide'." FEBS Lett **583**(11): 1713-1720.

Inagaki-Ohara, K., Kondo, T., Ito, M. and Yoshimura, A. (2013). "SOCS, inflammation, and cancer." JAKSTAT **2**(3): e24053.

James, C., Ugo, V., Le Couedic, J. P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J. L., Constantinescu, S. N., Casadevall, N. and Vainchenker, W. (2005). "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera." Nature **434**(7037): 1144-1148.

Jamieson, C. H., Gotlib, J., Durocher, J. A., Chao, M. P., Mariappan, M. R., Lay, M., Jones, C., Zehnder, J. L., Lilleberg, S. L. and Weissman, I. L. (2006). "The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(16): 6224-6229.

Jatiani, S. S., Baker, S. J., Silverman, L. R. and Reddy, E. P. (2010). "Jak/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: approaches for targeted therapies." Genes Cancer **1**(10): 979-993.

Jeong, E. G., Kim, M. S., Nam, H. K., Min, C. K., Lee, S., Chung, Y. J., Yoo, N. J. and Lee, S. H. (2008). "Somatic mutations of JAK1 and JAK3 in acute leukemias and solid cancers." Clin Cancer Res **14**(12): 3716-3721.

Jones, A. V. and Cross, N. C. (2013). "Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms." Ther Adv Hematol **4**(4): 237-253.

Kazi, J. U., Kabir, N. N., Flores-Morales, A. and Ronnstrand, L. (2014). "SOCS proteins in regulation of receptor tyrosine kinase signaling." *Cell Mol Life Sci* **71**(17): 3297-3310.

Kearney, L., Gonzalez De Castro, D., Yeung, J., Procter, J., Horsley, S. W., Eguchi-Ishimae, M., Bateman, C. M., Anderson, K., Chaplin, T., Young, B. D., Harrison, C. J., Kempinski, H., So, C. W., Ford, A. M. and Greaves, M. (2009). "Specific JAK2 mutation (JAK2R683) and multiple gene deletions in Down syndrome acute lymphoblastic leukemia." *Blood* **113**(3): 646-648.

Kouroupi, E., Zoi, K., Parquet, N., Zoi, C., Kiladjian, J. J., Grigoraki, V., Vainchenker, W., Lellouche, F., Marzac, C., Schlageter, M. H., Dosquet, C., Scott, L. M., Fenaux, P., Loukopoulos, D., Chomienne, C. and Cassinat, B. (2008). "Mutations in exon 12 of JAK2 are mainly found in JAK2 V617F-negative polycythaemia vera patients." *Br J Haematol* **142**(4): 676-679.

Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A. S., Teo, S. S., Tiedt, R., Passweg, J. R., Tichelli, A., Cazzola, M. and Skoda, R. C. (2005). "A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders." *N Engl J Med* **352**(17): 1779-1790.

Krempler, A., Qi, Y., Triplett, A. A., Zhu, J., Rui, H. and Wagner, K. U. (2004). "Generation of a conditional knockout allele for the Janus kinase 2 (Jak2) gene in mice." *Genesis* **40**(1): 52-57.

Kuang, S. Q., Bai, H., Fang, Z. H., Lopez, G., Yang, H., Tong, W., Wang, Z. Z. and Garcia-Manero, G. (2010). "Aberrant DNA methylation and epigenetic inactivation of Eph receptor tyrosine kinases and ephrin ligands in acute lymphoblastic leukemia." *Blood* **115**(12): 2412-2419.

Kulis, M. and Esteller, M. (2010). "DNA methylation and cancer." *Adv Genet* **70**: 27-56.

Lacronique, V., Boureux, A., Valle, V. D., Poiriel, H., Quang, C. T., Mauchauffe, M., Berthou, C., Lessard, M., Berger, R., Ghysdael, J. and Bernard, O. A. (1997). "A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia." *Science* **278**(5341): 1309-1312.

Lee, T. S. (2013). "On the regulation and activation of JAK2: a novel hypothetical model." *Mol Cancer Res* **11**(8): 811-814.

Lee, T. S., Ma, W., Zhang, X., Kantarjian, H. and Albitar, M. (2009). "Structural effects of clinically observed mutations in JAK2 exons 13-15: comparison with V617F and exon 12 mutations." *BMC Struct Biol* **9**: 58.

Levine, R. L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B. L., Wernig, G., Huntly, B. J., Boggon, T. J., Wlodarska, I., Clark, J. J., Moore, S., Adelsperger, J., Koo, S., Lee, J. C., Gabriel, S., Mercher, T., D'Andrea, A., Frohling, S., Dohner, K., Marynen, P., Vandenberghe, P., Mesa, R. A., Tefferi, A., Griffin, J. D., Eck, M. J., Sellers, W. R., Meyerson, M., Golub, T. R., Lee, S. J. and Gilliland, D. G. (2005). "Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis." *Cancer Cell* **7**(4): 387-397.

Liongue, C. and Ward, A. C. (2013). "Evolution of the JAK-STAT pathway." *JAKSTAT* **2**(1): e22756.

Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q. M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A. H., Thomson, J. A., Ren, B. and Ecker, J. R. (2009). "Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences." *Nature* **462**(7271): 315-322.

- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lobie, P. E., Ronsin, B., Silvennoinen, O., Haldosen, L. A., Norstedt, G. and Morel, G. (1996). "Constitutive nuclear localization of Janus kinases 1 and 2." Endocrinology **137**(9): 4037-4045.
- Loeb, L. A. (2001). "A mutator phenotype in cancer." Cancer Res **61**(8): 3230-3239.
- Lopez-Nieva, P., Vaquero, C., Fernandez-Navarro, P., Gonzalez-Sanchez, L., Villa-Morales, M., Santos, J., Esteller, M. and Fernandez-Piqueras, J. (2012). "EPHA7, a new target gene for 6q deletion in T-cell lymphoblastic lymphomas." Carcinogenesis **33**(2): 452-458.
- Ma, W., Kantarjian, H., Zhang, X., Yeh, C. H., Zhang, Z. J., Verstovsek, S. and Albitar, M. (2009). "Mutation profile of JAK2 transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias." J Mol Diagn **11**(1): 49-53.
- Matthews, J. M., Lester, K., Joseph, S. and Curtis, D. J. (2013). "LIM-domain-only proteins in cancer." Nat Rev Cancer **13**(2): 111-122.
- McCormack, M. P., Young, L. F., Vasudevan, S., de Graaf, C. A., Codrington, R., Rabbitts, T. H., Jane, S. M. and Curtis, D. J. (2010). "The Lmo2 oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal." Science **327**(5967): 879-883.
- Mullighan, C. G., Collins-Underwood, J. R., Phillips, L. A., Loudin, M. G., Liu, W., Zhang, J., Ma, J., Coustan-Smith, E., Harvey, R. C., Willman, C. L., Mikhail, F. M., Meyer, J., Carroll, A. J., Williams, R. T., Cheng, J., Heerema, N. A., Basso, G., Pession, A., Pui, C. H., Raimondi, S. C., Hunger, S. P., Downing, J. R., Carroll, W. L. and Rabin, K. R. (2009). "Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia." Nat Genet **41**(11): 1243-1246.
- Mullighan, C. G., Zhang, J., Harvey, R. C., Collins-Underwood, J. R., Schulman, B. A., Phillips, L. A., Tasian, S. K., Loh, M. L., Su, X., Liu, W., Devidas, M., Atlas, S. R., Chen, I. M., Clifford, R. J., Gerhard, D. S., Carroll, W. L., Reaman, G. H., Smith, M., Downing, J. R., Hunger, S. P. and Willman, C. L. (2009). "JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(23): 9414-9418.
- Muñoz, A. and Barbacid, M. (1997). Cancer [genes y nuevas terapias. Serie Nexus, 2. Madrid, Helice,: xxv, 373 p.
- Murray, P. J. (2007). "The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration." J Immunol **178**(5): 2623-2629.
- Nam, C. H. and Rabbitts, T. H. (2006). "The role of LMO2 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion." Mol Ther **13**(1): 15-25.
- Neubauer, H., Cumano, A., Muller, M., Wu, H., Huffstadt, U. and Pfeffer, K. (1998). "Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis." Cell **93**(3): 397-409.
- Neumann, M., Vosberg, S., Schlee, C., Heesch, S., Schwartz, S., Gokbuget, N., Hoelzer, D., Graf, A., Krebs, S., Bartram, I., Blum, H., Bruggemann, M., Hecht, J., Bohlander, S. K., Greif, P. A. and Baldus, C. D. (2015). "Mutational spectrum of adult T-ALL." Oncotarget **6**(5): 2754-2766.

- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." *Science* **194**(4260): 23-28.
- Oka, T., Ouchida, M., Koyama, M., Ogama, Y., Takada, S., Nakatani, Y., Tanaka, T., Yoshino, T., Hayashi, K., Ohara, N., Kondo, E., Takahashi, K., Tsuchiyama, J., Tanimoto, M., Shimizu, K. and Akagi, T. (2002). "Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas." *Cancer Res* **62**(22): 6390-6394.
- Paska, A. V. and Hudler, P. (2015). "Aberrant methylation patterns in cancer: a clinical view." *Biochem Med (Zagreb)* **25**(2): 161-176.
- Peeters, P., Raynaud, S. D., Cools, J., Wlodarska, I., Grosgeorge, J., Philip, P., Monpoux, F., Van Rompaey, L., Baens, M., Van den Berghe, H. and Marynen, P. (1997). "Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia." *Blood* **90**(7): 2535-2540.
- Peng, Z., Cheng, Y., Tan, B. C., Kang, L., Tian, Z., Zhu, Y., Zhang, W., Liang, Y., Hu, X., Tan, X., Guo, J., Dong, Z., Liang, Y., Bao, L. and Wang, J. (2012). "Comprehensive analysis of RNA-Seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptome." *Nat Biotechnol* **30**(3): 253-260.
- Pietra, D., Li, S., Brisci, A., Passamonti, F., Rumi, E., Theocharides, A., Ferrari, M., Gisslinger, H., Kralovics, R., Cremonesi, L., Skoda, R. and Cazzola, M. (2008). "Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders." *Blood* **111**(3): 1686-1689.
- Rabbitts, T. H. (1998). "LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes." *Genes Dev* **12**(17): 2651-2657.
- Rebhandl, S., Huemer, M., Greil, R. and Geisberger, R. (2015). "AID/APOBEC deaminases and cancer." *Oncoscience* **2**(4): 320-333.
- Rinaldi, C. R., Rinaldi, P., Alagia, A., Gemei, M., Esposito, N., Formiggini, F., Martinelli, V., Senyuk, V., Nucifora, G. and Pane, F. (2010). "Preferential nuclear accumulation of JAK2V617F in CD34+ but not in granulocytic, megakaryocytic, or erythroid cells of patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasia." *Blood* **116**(26): 6023-6026.
- Rodríguez-Paredes, M. and Esteller, M. (2011). "Cancer epigenetics reaches mainstream oncology." *Nat Med* **17**(3): 330-339.
- Romana, S. P., Mauchauffe, M., Le Coniat, M., Chumakov, I., Le Paslier, D., Berger, R. and Bernard, O. A. (1995). "The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion." *Blood* **85**(12): 3662-3670.
- Saharinen, P. and Silvennoinen, O. (2002). "The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction." *J Biol Chem* **277**(49): 47954-47963.
- Saharinen, P., Takaluoma, K. and Silvennoinen, O. (2000). "Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain." *Mol Cell Biol* **20**(10): 3387-3395.
- Salmond, R. J. and Alexander, D. R. (2006). "SHP2 forecast for the immune system: fog gradually clearing." *Trends Immunol* **27**(3): 154-160.

Santos, J., Gonzalez-Sanchez, L., Matabuena-Deyzaguirre, M., Villa-Morales, M., Cozar, P., Lopez-Nieva, P., Fernandez-Navarro, P., Fresno, M., Diaz-Munoz, M. D., Guenet, J. L., Montagutelli, X. and Fernandez-Piqueras, J. (2009). "A role for stroma-derived annexin A1 as mediator in the control of genetic susceptibility to T-cell lymphoblastic malignancies through prostaglandin E2 secretion." *Cancer Res* **69**(6): 2577-2587.

Santos, J., Gonzalez-Sanchez, L., Villa-Morales, M., Ors, I., Lopez-Nieva, P., Vaquero, C., Gonzalez-Gugel, E., Fernandez-Navarro, P., Roncero, A. M., Guenet, J. L., Montagutelli, X. and Fernandez-Piqueras, J. (2010). "The stromal gene encoding the CD274 antigen as a genetic modifier controlling survival of mice with gamma-radiation-induced T-cell lymphoblastic lymphomas." *Oncogene* **29**(38): 5265-5273.

Scott, L. M., Tong, W., Levine, R. L., Scott, M. A., Beer, P. A., Stratton, M. R., Futreal, P. A., Erber, W. N., McMullin, M. F., Harrison, C. N., Warren, A. J., Gilliland, D. G., Lodish, H. F. and Green, A. R. (2007). "JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis." *N Engl J Med* **356**(5): 459-468.

Schnittger, S., Bacher, U., Haferlach, C., Geer, T., Muller, P., Mittermuller, J., Petrides, P., Schlag, R., Sandner, R., Selbach, J., Slawik, H. R., Tessen, H. W., Wehmeyer, J., Kern, W. and Haferlach, T. (2009). "Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2V617F negative polycythemia vera." *Haematologica* **94**(3): 414-418.

Schultz, M. D., He, Y., Whitaker, J. W., Hariharan, M., Mukamel, E. A., Leung, D., Rajagopal, N., Nery, J. R., Urich, M. A., Chen, H., Lin, S., Lin, Y., Jung, I., Schmitt, A. D., Selvaraj, S., Ren, B., Sejnowski, T. J., Wang, W. and Ecker, J. R. (2015). "Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation." *Nature* **523**(7559): 212-216.

Schwaller, J., Frantsve, J., Aster, J., Williams, I. R., Tomasson, M. H., Ross, T. S., Peeters, P., Van Rompaey, L., Van Etten, R. A., Ilaria, R., Jr., Marynen, P. and Gilliland, D. G. (1998). "Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced TEL/JAK2 fusion genes." *EMBO J* **17**(18): 5321-5333.

Shih, A. H., Abdel-Wahab, O., Patel, J. P. and Levine, R. L. (2012). "The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies." *Nat Rev Cancer* **12**(9): 599-612.

Shuai, K. and Liu, B. (2003). "Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system." *Nat Rev Immunol* **3**(11): 900-911.

Slotkin, W. and Nishikura, K. (2013). "Adenosine-to-inosine RNA editing and human disease." *Genome Med* **5**(11): 105.

Smith, H. C., Gott, J. M. and Hanson, M. R. (1997). "A guide to RNA editing." *RNA* **3**(10): 1105-1123.

Sorenson, R. L. and Stout, L. E. (1995). "Prolactin receptors and JAK2 in islets of Langerhans: an immunohistochemical analysis." *Endocrinology* **136**(9): 4092-4098.

Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J. and Vardiman, J. W., (Eds.) (2008). *WHO classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon, International Agency for Research on Cancer.

Tefferi, A. (2010). "Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1." *Leukemia* **24**(6): 1128-1138.

- Tomaselli, S., Locatelli, F. and Gallo, A. (2014). "The RNA editing enzymes ADARs: mechanism of action and human disease." *Cell Tissue Res* **356**(3): 527-532.
- Treanor, L. M., Volanakis, E. J., Zhou, S., Lu, T., Sherr, C. J. and Sorrentino, B. P. (2011). "Functional interactions between Lmo2, the Arf tumor suppressor, and Notch1 in murine T-cell malignancies." *Blood* **117**(20): 5453-5462.
- Vainchenker, W. and Constantinescu, S. N. (2013). "JAK/STAT signaling in hematological malignancies." *Oncogene* **32**(21): 2601-2613.
- Vainchenker, W., Dusa, A. and Constantinescu, S. N. (2008). "JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies." *Semin Cell Dev Biol* **19**(4): 385-393.
- Van Vlierberghe, P. and Ferrando, A. (2012). "The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia." *J Clin Invest* **122**(10): 3398-3406.
- Villa-Morales, M., Cobos, M. A., Gonzalez-Gugel, E., Alvarez-Iglesias, V., Martinez, B., Piris, M. A., Carracedo, A., Benitez, J. and Fernandez-Piqueras, J. (2014). "FAS system deregulation in T-cell lymphoblastic lymphoma." *Cell Death Dis* **5**: e1110.
- Villa-Morales, M., Gonzalez-Gugel, E., Shahbazi, M. N., Santos, J. and Fernandez-Piqueras, J. (2010). "Modulation of the Fas-apoptosis-signalling pathway by functional polymorphisms at Fas, FasL and Fadd and their implication in T-cell lymphoblastic lymphoma susceptibility." *Carcinogenesis* **31**(12): 2165-2171.
- Villa-Morales, M., Santos, J. and Fernandez-Piqueras, J. (2006). "Functional Fas (Cd95/Apo-1) promoter polymorphisms in inbred mouse strains exhibiting different susceptibility to gamma-radiation-induced thymic lymphoma." *Oncogene* **25**(14): 2022-2029.
- Villa-Morales, M., Santos, J., Perez-Gomez, E., Quintanilla, M. and Fernandez-Piqueras, J. (2007). "A role for the Fas/FasL system in modulating genetic susceptibility to T-cell lymphoblastic lymphomas." *Cancer Res* **67**(11): 5107-5116.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (2004). "Cancer genes and the pathways they control." *Nat Med* **10**(8): 789-799.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., Jr. and Kinzler, K. W. (2013). "Cancer genome landscapes." *Science* **339**(6127): 1546-1558.
- Weber, A., Hengge, U. R., Bardenheuer, W., Tischoff, I., Sommerer, F., Markwarth, A., Dietz, A., Wittekind, C. and Tannapfel, A. (2005). "SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition." *Oncogene* **24**(44): 6699-6708.
- Wedekind, J. E., Dance, G. S., Sowden, M. P. and Smith, H. C. (2003). "Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business." *Trends Genet* **19**(4): 207-216.
- Weinberg, R. A. (1995). "The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes." *Ann N Y Acad Sci* **758**: 331-338.
- Wu, C., Sun, M., Liu, L. and Zhou, G. W. (2003). "The function of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in cancer." *Gene* **306**: 1-12.

Yamamoto, H., Perez-Piteira, J., Yoshida, T., Terada, M., Itoh, F., Imai, K. and Perucho, M. (1999). "Gastric cancers of the microsatellite mutator phenotype display characteristic genetic and clinical features." *Gastroenterology* **116**(6): 1348-1357.

Yamamoto, H., Sawai, H., Weber, T. K., Rodriguez-Bigas, M. A. and Perucho, M. (1998). "Somatic frameshift mutations in DNA mismatch repair and proapoptosis genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." *Cancer Res* **58**(5): 997-1003.

Yamaoka, K., Saharinen, P., Pesu, M., Holt, V. E., 3rd, Silvennoinen, O. and O'Shea, J. J. (2004). "The Janus kinases (Jaks)." *Genome Biol* **5**(12): 253.

Yoda, A., Yoda, Y., Chiaretti, S., Bar-Natan, M., Mani, K., Rodig, S. J., West, N., Xiao, Y., Brown, J. R., Mitsiades, C., Sattler, M., Kutok, J. L., DeAngelo, D. J., Wadleigh, M., Piciocchi, A., Dal Cin, P., Bradner, J. E., Griffin, J. D., Anderson, K. C., Stone, R. M., Ritz, J., Foa, R., Aster, J. C., Frank, D. A. and Weinstock, D. M. (2010). "Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(1): 252-257.

Yoshimura, A., Naka, T. and Kubo, M. (2007). "SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation." *Nat Rev Immunol* **7**(6): 454-465.

You, J. S. and Jones, P. A. (2012). "Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?" *Cancer Cell* **22**(1): 9-20.

Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S. L., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X., Wang, J., Rusch, M., Lu, C., Chen, S. C., Wei, L., Collins-Underwood, J. R., Ma, J., Roberts, K. G., Pounds, S. B., Ulyanov, A., Becksfort, J., Gupta, P., Huether, R., Kriwacki, R. W., Parker, M., McGoldrick, D. J., Zhao, D., Alford, D., Espy, S., Bobba, K. C., Song, G., Pei, D., Cheng, C., Roberts, S., Barbato, M. I., Campana, D., Coustan-Smith, E., Shurtleff, S. A., Raimondi, S. C., Kleppe, M., Cools, J., Shimano, K. A., Hermiston, M. L., Doulatov, S., Eppert, K., Laurenti, E., Notta, F., Dick, J. E., Basso, G., Hunger, S. P., Loh, M. L., Devidas, M., Wood, B., Winter, S., Dunsmore, K. P., Fulton, R. S., Fulton, L. L., Hong, X., Harris, C. C., Dooling, D. J., Ochoa, K., Johnson, K. J., Obenauer, J. C., Evans, W. E., Pui, C. H., Naeve, C. W., Ley, T. J., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Downing, J. R. and Mullighan, C. G. (2012). "The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia." *Nature* **481**(7380): 157-163.

Zhang, Q., Raghunath, P. N., Vonderheid, E., Odum, N. and Wasik, M. A. (2000). "Lack of phosphotyrosine phosphatase SHP-1 expression in malignant T-cell lymphoma cells results from methylation of the SHP-1 promoter." *Am J Pathol* **157**(4): 1137-1146.



Anexo I

Tabla Suplementaria 1. Linfomas primarios, T-LBLs.

Código de muestra	Sexo	Edad	Células tumorales	Tdt	PAX5	CD3	CD4	CD8	CD2	CD1a	CD34	CD117	MPO	Caracterización
#038	Masculino	Pediátrico												T-LBL (subtipo desconocido)
#080	Femenino	Pediátrico		+		+	+	-	+	-	-			Medular/T-LBL maduro
#154	Femenino	Pediátrico	>80%		-	+	-	-		-	-			T-LBL inmaduro
#226	Masculino	Pediátrico	80%	+	-	+	+ débil	+ débil						Cortical / T-LBL común
#460	Masculino	Pediátrico	70%	+	-	+	+	+	+	-				Medular / T-LBL maduro
#516	Masculino	Pediátrico	70%	+	-	+	-							T-LBL (subtipo desconocido)
#521	Masculino	Pediátrico	90%	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	Cortical / T-LBL común
#734	Femenino	Pediátrico	80%	+	-	+	+	-						Medular / T-LBL maduro
#135	Masculino	Adulto	100%	+		+	+	+	+	-	-	-		Medular / T-LBL maduro
#188	Masculino	Adulto												T-LBL (subtipo desconocido)
#192	Masculino	Adulto	90%	+	-	+	+ débil	+	+	+ débil	-	+	-	Cortical / T-LBL común
#238	Femenino	Adulto	>80%	+	-	+	-	-			-	-	-	Pre-T / T-LBL inmaduro
#346	Masculino	Adulto	95%	+	-	+	+	+	+ débil		-	-	-	Cortical / T-LBL común
#408	Femenino	Adulto	>80%	+	-	+	+	+			-	-	-	Cortical / T-LBL común
#685	Masculino	Adulto	80%	+	-	+	+	+						Cortical / T-LBL común
#829	Femenino	Adulto		+		+					+		+	T-LBL inmaduro

Tabla Suplementaria 2. Cebadores utilizados en este trabajo.

Secuencia (5' → 3')			Tamaño	Referencia
Amplificación del ADNc de JAK2				
ADNc JAK2	se	AAGACTCTGCATGGGAATG	3432 pb.	
	as	TCTCAGAATGAAGGTCATT		
pareja 1 sec ADNc JAK2	se	GCGGCATGATTTGTGCA		
	as	CCACTGAGCAAAAGAGGTA		
pareja 2 sec ADNc JAK2	se	TTGATGTCAGTATTAAGCAAGC		
	as	GCTAAGTCAATTCCAG		
pareja 3 sec ADNc JAK2	se	ATAATTTCCAGTTACT		
	as	TATTGTCTGAGCGAACAG		
pareja 4 sec ADNc JAK2	se	GGCATGGGCCATGCATT		
	as	CAACTGTTAGCAACTTC		
Búsqueda translocación				
TEL-JAK2	se	CGTGGATTCAACAGTCCA	296 pb.	
	as	CCTTGCCAAGTGTCTGAGA		
Análisis mutacional				
JAK2 11_17	se	AGTACAACCTCAGTGGGAC	863 pb	
	as	ACTGCAGATTTCCACAA		
sec JAK2 11_17	se	GCAGCAAGTATGATGAGC		
	as	CAAATCCTGAACCAGAA		
Metilación SHP1				
hsa-SHP1 1st	se	GGTGTGGTGAGAAATAATTAG		Soto <i>et al.</i> , 2010
	as	CCTCAAATACAACCTCCCAATACC		
hsa-SHP1 hMSP M	se	GGATCGTTGGGTTCGTATGC		Soto <i>et al.</i> , 2010
	as	ACAAAAAAAAACGCGACCGACC		
hsa-SHP1 hMSP U	se	GGATGTGTTGGGTTGTATGTGT		Soto <i>et al.</i> , 2010
	as	AACAAAAAAAAACACAACCAACCC		
hsa-SHP1 hBS	se	GTGAAGTATTATTGGGTTTGG		
	as	ACCACTCCACTAACCTAAAAACA		
Metilación SOCS1				
hsa-SOCS1 hMSP M	se	TTCGCGTGATTTTAGGTCGGTC		Yoshikawa <i>et al.</i> , 2001
	as	CGACACAACCTCTACAACGACCG		
hsa-SOCS1 hMSP U	se	TTATGAGTATTGTGTATTTTAGGTTGGTT		Yoshikawa <i>et al.</i> , 2001
	as	CACTAACACACAACCTCTACAACAACCA		
Metilación SOCS3				
hsa-SOCS3 hMSP M	se	GTAGTGCCTAAGTTGTAGGAGAGC		Weber <i>et al.</i> , 2005
	as	GTAAAAAATAACGCTAATCCGAA		
hsa-SOCS3 hMSP U	se	TAGTGTGAAGTGTAGGAGAGTGG		Weber <i>et al.</i> , 2005
	as	CTAAACATAAAAAATAACACTAATCCAAA		
hsa-SOCS3 hBS U	se	GGGATGAGTYGTTTTTGG		
	as	AAAAACTACCCCTCACACTA		

Continuación Tabla Suplementaria 2. Cebadores utilizados en este trabajo.

Secuencia (5' → 3')			Tamaño	Referencia
Mutagénesis dirigida				
E549K	se	caaaatcagaaatgaagatttgatatttaataaagcccttgccaaggc		
	as	gccttggccaaggctttatttaaatatcaaatcttcatttctgatttgg		
K558R	se	ggccaaggcacttttacaaggatttttaaggcgtagca		
	as	tctgacgcctttaaaatccttgtaaaagtgccctggcc		
H574R	se	ggagactacggtaactgcgtgaacacagaagtctttta		
	as	taaaagaacttctgtttcacgcagttgaccgtagtctcc		
L634P	se	gttcaggagittgtaaaattggatcacagatacatatctgaaaagaataaaaat		
	as	atttttattcttttcagatatgtatctgggtgatccaaattttacaactcctgaac		
I682T	se	gccaaaaatattctgcttatcggagaagaagacaggaagacag		
	as	ctgtcttctgtcttcttctcggataagcagaataattttggc		
R683G	se	gtgccaaaaatattctgcttacagagaagaagacaggaaga		
	as	tcttctctgtcttcttctctgtgaagcagaataattttggcac		
qRT-PCR				
JAK2	se	CGTGGATTCAACAGTCCA	187 pb.	
	as	CCTCAGATTCCCAAGGGAA		
LMO2	se	CACGAGGACTGCCTGAGC	128 pb	
	as	AGACCGTCTTGCCCAAAA		
SOCS3	se	GACCTGAAGGGAACCATCCT	63 pb	
	as	TGTGTTTCGGTACTGTCC		
B2M	se	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC	269 pb.	
	as	CGAGACATGTAAGCAGCATC		
Pirosecuenciación JAK2				
BIO-Pyro-JAK2_Ex13_cdna-F1		[Bfn]CCAAATGGTGTTCACAAAATCA		
Pyro-JAK2_Ex13_cdna-R1		GCTCATCATACTTGCTGCTTCAAA		
Pyro-JAK2_Ex13_cdna-seq		CAAAGAAAGACTCTGAATAG		
Pyro-JAK2_Ex13_cdna-seq2		CAAAGAAAGACTCTGAATAG		
BIO-Pyro-JAK2_Ex13_gDNA-F1		[Bfn]TTCITGTTCTACTTCGTCTCC		
Pyro-JAK2_Ex13_gDNA-R1		AAGCTGCACACATGAGTACGTT		
Pyro-JAK2_Ex13_gDNA-seq		CATACACACCTCTGAATAGT		
Pyro-JAK2_Ex13_gDNA-seq2		AGTCTCTACTTCTCTTCG		
BIO-Pyro-JAK2_Ex15_cdna-F1		[Bfn]ATTCTGGTTCAGGAGTTTGAAAA		
Pyro-JAK2_Ex15_cdna-R1		CCCATGAATAAGGGTGTITCT		
Pyro-JAK2_Ex15_cdna-seq		TCTAGAAAATGCATGGC		
Pyro-JAK2_Ex15_gDNA-F1		CAGGAGTTTGTAATAATTGGATCA		
BIO-Pyro-JAK2_Ex15_gDNA-R1		[Bfn]CTATTTACATGAATGGCATCCA		
Pyro-JAK2_Ex15_gDNA-seq		TTTGTAATAATTGGATCAC		
BIO-Pyro-JAK2_Ex16_cdna-F1		[Bfn]CCCTATTATGGAATGTATGTG		
Pyro-JAK2_Ex16_cdna-R1		ACTGCAGATTCCCAAAAGTG		
Pyro-JAK2_Ex16_cdna-seq		ATGGTATCTCTCTGAAG		
Pyro-JAK2_Ex16_cdna-seq2		CTAAGTTTGATGAAAGGAG		
Pyro-JAK2_Ex16-gDNA-F1		GGGCTTGAACATACTAAATGCTCC		
BIO-Pyro-JAK2_Ex16-gDNA-R1		[Bfn]TGCCAGGATCACTAAGTTTGATG		
Pyro-JAK2_Ex16-gDNA-seq		GGAATGTATGTGCCAA		
Pirosecuenciación SOCS3				
Pyro-SOCS3_3-F1		GTTATGGTATTATAGTAAGTTT		
BIO-Pyro-SOCS3_3-R1		[Bfn]TACAAAAAAAACACCCCCCTCA		
Pyro-SOCS3_3-seq		AGTATTAGTTGGTGGTGAA		



Anexo II

